

Versuchstier des Jahres 2016:

Der Fisch



Foto: mikhailg, Fotolia.com

Stumm, aber nicht schmerzfrei:
Der in der Forschung beliebte Zebrafisch (*Danio rerio*).

Inhalt

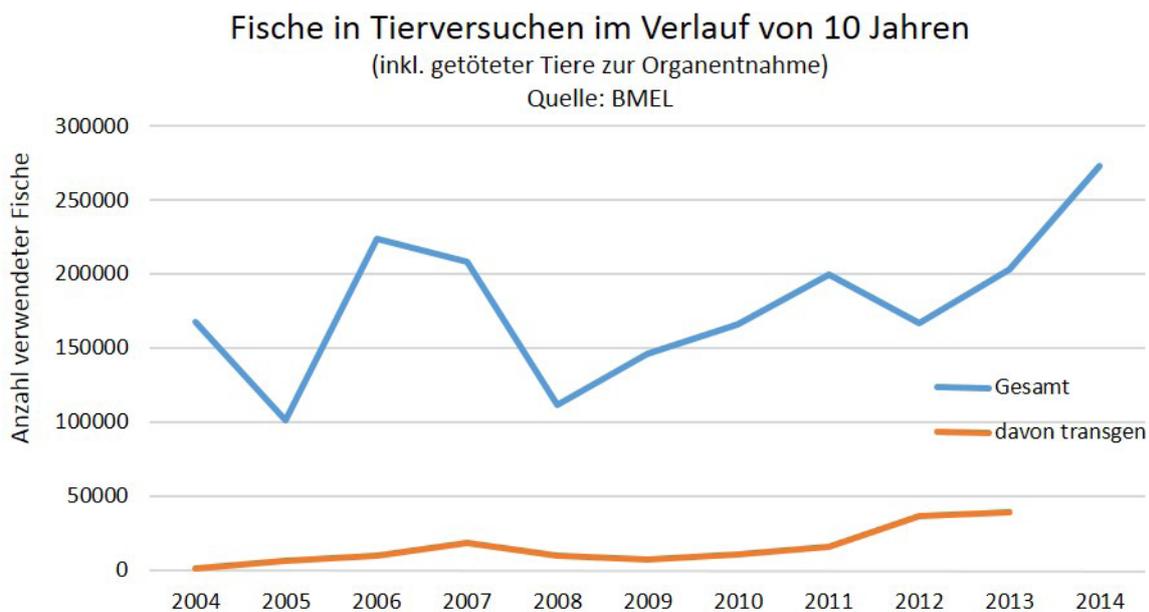
Versuchstier des Jahres 2016: Der Fisch	3
Fast 300.000 Fische im Tierversuch	3
Wird am häufigsten verwendet: der Zebrabärbling	4
Genetische Manipulation der Fische	5
Synthetische Gentechnik lässt Zahl der „Versuchtiere“ steigen	5
Fische leiden unter Schmerzen, Stress und Angst	7
Schmerz: Fische können sich erinnern	7
Leid: Keine klare Definition	8
Diabetes-Versuche mit Zebrafischen	9
Rückenflossen werden amputiert	9
Fluoreszierende Zebrafische zur Erforschung von Gefäßschäden	10
Künstlich erzeugt: Herzmuskelerkrankungen bei Zebrabärblingen	11
Verletzte Herzen und Hitzeschocks	11
Die Hälfte der Fische sterben in akuten Giftigkeitstests	11
Leidensreduzierung: Fischembryos statt ausgewachsene Fische	12
Fischembryotest gilt nicht als Tierversuch	12
Problem: Fischembryotest wird nicht von allen Behörden anerkannt	12
Fischembryotest auf dem Prüfstand	13
Fische in Langzeit-Giftigkeitstests	13
Fische werden über 28 Tage einer giftigen Substanz ausgesetzt	14
Lichtblicke: Giftigkeitsprüfungen ohne Fische	14
Kombination von Zelllinien dokumentiert Erbgutveränderungen	14
Zellen dokumentieren Wirkung schädlicher Metalle	14
Fischvirus: Zellen ermöglichen Untersuchung	15
EU fordert Nutzung mehrerer Ansätze	15
Einsatzmöglichkeiten von Zellinientests werden überprüft	16
Ferne Zukunftsvision: Fish-on-a-Chip	17
Softwareprogramme ergänzen Zelltests	17
Abwassertests: Fischeier statt Goldorfen	17
Längerfristige Tests ohne Fischeinsatz	17
Humane Krankheitsmodelle statt genmanipulierte Fische	18
Ausblick: Nötig sind Investitionen und Kombinationsverfahren	18
Rechtsgrundlagen für Tierversuche an Fische	19
Quellen und Literatur	20

Versuchstier des Jahres 2016: Der Fisch

Der Fisch ist für die Forschung ein dankbares „Versuchstier“ – nicht umsonst rangiert er in der Tierversuchstatistik an dritter Stelle mit steigender Tendenz. Er lässt sich relativ leicht halten, schnell vermehren, eignet sich gut für gentechnische Manipulationen und Giftigkeitstests – und er hat keine Lobby. Doch der Fisch ist keine „Reflexmaschine“. Er leidet unter Schmerzen, Stress und Angst. Deswegen haben Menschen für Tierrechte – Bundesverband der Tierversuchgegner den Fisch zum Versuchstier des Jahres 2016 ernannt. Die Ernennung dient dazu, auf das Leid der Tiere im Labor aufmerksam zu machen. Indem wir Tierversuche mit Fischen bekannt machen, die vorhandenen tierversuchsfreien Verfahren vorstellen und aufzeigen, wo noch Entwicklungsarbeit nötig ist, tragen wir dazu bei, diese qualvollen Tierversuche möglichst bald zu beenden.

Fast 300.000 Fische im Tierversuch

In deutschen Tierversuchslaboren standen 2014 die Fische an dritter Stelle nach Mäusen und Ratten⁽¹⁾. Seit 2012 nehmen die Zahlen der in Tierversuchen eingesetzten Fischen rapide zu. Die letzte Steigerung um 35 Prozent erfolgte 2013/14 auf insgesamt 272.925 Fische. Das entspricht 9,8 Prozent aller Tierversuche. Auch im langjährigen Verlauf nehmen die Zahlen zu – und dies, obwohl es mittlerweile ein anerkanntes Verfahren ohne ausgewachsene Fische im Bereich der Umwelttoxikologie gibt. Hintergrund für die Zunahme der Zahlen ist der rapide Anstieg von gentechnisch veränderten Fischen: Im Jahr 2013 waren 19,3 Prozent der Fische, die zu Forschungszwecken verwendet wurden, gentechnisch manipuliert. Allein für die Untersuchung der Auswirkung einer Manipulation wurde in 2014 der Einsatz von 297.000 Zebrafischen genehmigt⁽²⁾. Damit rangieren die Fische bei den gentechnischen Veränderungen an zweiter Stelle nach den Mäusen.



Der Langzeitverlauf zeigt: Der Einsatz von Fischen im Tierversuch steigt. Auch der Anteil transgener Fische, von denen vor allem Zebrafische betroffen sind, wächst seit Jahren stetig (rote Linie). Lediglich in den Jahren 2005, 2007/08 und 2012 ist der „Verbrauch“ zurückgegangen.

Wird am häufigsten verwendet: der Zebrabärbling

Die in Tierversuchen verwendeten Fischarten sind vor allem der Zebrabärbling, aber auch Arten wie der Reiskärpfling oder Medaka, Forellen, Goldfische, Dorsche, Flussbarsche, Aale, Sprotten und Prachtgrundkärpflinge.



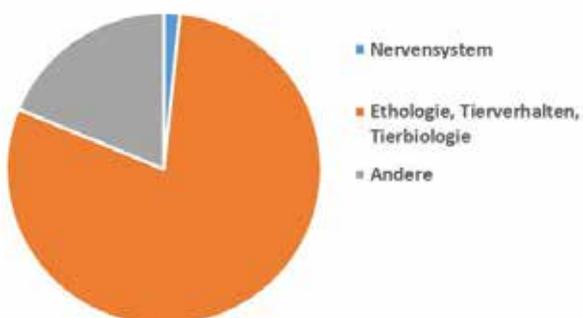
Reiskärpfling (Medaka, *Oryzias latipes*).

Foto: Seotaro

Die Fische leiden hauptsächlich in der Grundlagenforschung, die sich mit humanmedizinischen Fragestellungen beschäftigt. Die Grundlagenforschung nutzt Fische zudem, um Verfahren zur Manipulation des Genoms zu erforschen. Für Untersuchungen mit dem Ziel einer erfolgreichen genetischen Manipulation waren 2014 84 Prozent der genehmigten Versuche an Zebrabärblingen vorgesehen. Diese Fischart wird u. a. genetisch verändert, um etwas über menschliche Erkrankungen herauszufinden (z. B. Forschung zur Entwicklung des Herzens und der Blutgefäße (3,8 Prozent), der Knochenregeneration (3,4 Prozent) oder des Immunsystems (3,9 Prozent).

Tierversuche mit anderen Fischen in der Grundlagenforschung

(Anzahl beantragte Fische, Quelle: Animaltestinfo)



Tierversuche mit anderen Fischen zu verschiedenen Forschungszwecken

(Anzahl beantragte Fische, Quelle: Animaltestinfo)



Genetische Manipulation der Fische

Die Zahl der Tierversuche steigt im Bereich Gentechnik seit Jahren kontinuierlich an. Dies steht im Gegensatz zu den in Deutschland und der EU geltenden gesetzlichen Zielsetzungen, künftig weniger Versuchstiere für wissenschaftliche Zwecke einzusetzen. Steigende Tierversuchszahlen werden häufig durch kommerzielle Interessen verursacht. Maßgeschneiderte „Tierversuchsmodelle“ sind oft durch Patente geschützt, wie z. B. Thrombosemodelle, geschaffen durch gentechnische Veränderungen des Zebrafährblings. In diesen Fällen sind nicht nur die fertigen „Modelle“ mit einem Patent belegt, sondern auch die Techniken zur Herstellung der „Modelle“.

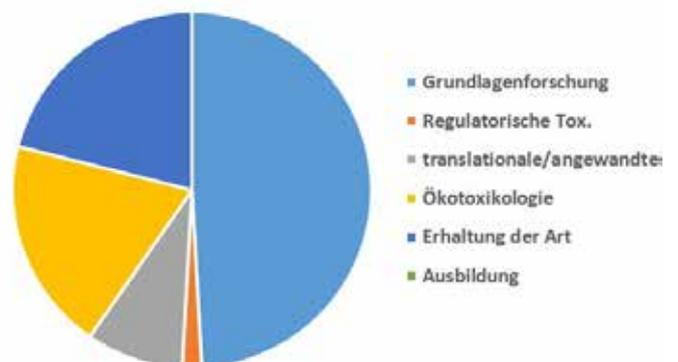
Synthetische Gentechnik lässt Zahl der „Versuchstiere“ steigen

Die neuen Methoden der synthetischen Gentechnik führen zusätzlich dazu, dass immer mehr „Versuchstiere“ in immer kürzerer Zeit gentechnisch manipuliert werden können. Die synthetische Gentechnik arbeitet hierbei mit sogenannten Gen-Scheren und künstlich synthetisierter DNA: Das CRISPR/Cas9-System ermöglicht ähnlich wie TALEN, DNA-Sequenzen an gewünschten Stellen zu schneiden. Dadurch können Sequenzbereiche entfernt (knock-out) und neue an der Schnittstelle eingefügt werden (knock-in). Die DNA-Abschnitte stammen meist von anderen Lebewesen, beispielsweise menschliche Gene in einer Maus oder einem Fisch. Die Herstellung eines genetisch modifizierten Organismus dauert durch diese Technik nur noch einige Wochen. Die Technik ist zwar präzise, aber noch nicht präzise genug. Manchmal werden Genstücke an falscher Stelle eingebaut oder Genbereiche an einer nicht gewünschten Stelle der DNA gelöscht. Dies kann u. a. zu unerwarteten Mutationen führen, die oft großes Leid bei den manipulierten Tieren hervorrufen⁽³⁾.

Zebrafische in beantragten Tierversuchen 2014
(Anträge n=24) (Quelle: Animaltestinfo.de)



Andere Fische in Tierversuchen 2014
(Anträge n=57) (Quelle: Animaltestinfo.de)





Junger Flussbarsch (Perca fluviatilis).

Foto: Markus Koller, Fotolia.com

Bei den anderen Fischarten, wie Dorsch, Buntbarsch, Flussbarsch, Karpfen und Forelle, spielt ebenfalls vor allem die Grundlagenforschung eine Rolle (knapp 50 Prozent), aber auch Untersuchungen zur Umwelttoxikologie (20 Prozent), zur Erhaltung der Art (21 Prozent) zur Zucht, zur Haltung sowie zur Wiederansiedlung oder Wanderung. Die Forschungen zu Zucht- und Haltungsbedingungen für Fische im Rahmen der Lebensmittelerzeugung dienen vor allem dem Zweck, Fisch als Nahrungsmittel für den Menschen zu sichern. Dies ist wiederum mit großem Tierleid in der Intensivtierhaltung in Aquakulturen und der Tötung verbunden⁽⁴⁾.



Forschung im Dienste der Massenfischzucht: Künstliche Fischzuchten in hoher Dichte bedrohen die Artenvielfalt. Monokulturen begünstigen den Ausbruch von Infektionskrankheiten und Umweltverschmutzungen.

Foto: Phimak, Fotolia.com

Fische leiden unter Schmerzen, Stress und Angst

Der vermeintlich stumme Fisch wird unterschätzt: Fische sind lernfähig, sie jagen koordiniert im Team, spielen, benutzen Werkzeuge und können teilweise Mengen unterscheiden^(5, 6, 7, 8, 9). Sie erleiden aber auch Schmerzen und Stress⁽¹⁰⁾. Bereits in den 80er Jahren wurde schon zweifelsfrei belegt, dass Fische leidensfähig sind. Dies wurde in den 90er Jahren auch gerichtlich bestätigt (OLG Celle, AZ 23 Ss 50/97)⁽¹¹⁾. Sowohl die Europäische Kommission als auch die EFSA bestätigten 2009, dass die Reaktionen bestimmter Fischarten in bestimmten Situationen annehmen lässt, dass sie auch in der Lage sind, Angst zu empfinden⁽¹²⁾. Auf Grundlage naturwissenschaftlicher Untersuchungen zu Fischen kommt Markus Wild, Prof. für theoretische Philosophie an der Universität Basel in einem Gutachten zum Schmerzempfinden bei Fischen⁽¹³⁾ zu dem Ergebnis, dass sich Fische nicht so sehr von Säugetieren unterscheiden. Auch wenn sie es nicht deutlich zeigen können: Fische leiden unter Schmerzen und unter Stress. Aber – anders als bei Säugetieren – können Fische ihren Schmerz nicht artikulieren. Deshalb sah man Fische lange Zeit nur als reine Reflexmaschinen, die man eher als Masse oder Schwarm wahrnahm.



Zwei Karpfen.

Foto: Kletr

Schmerz: Fische können sich erinnern

Die Wissenschaftler Ollenschläger & Reichenbach-Klinke beschrieben schon 1979 die anatomischen Voraussetzungen von Fischen für die Schmerzaufnahme und Weiterleitung durch Nervenendigungen⁽¹¹⁾. Bernatzky wies 1997 in der Haut von Forellen Schmerztransmitter nach, die

sogenannte Substanz P.⁽¹¹⁾. Diese ist ein Botenstoff (Neurotransmitter), der eine Rolle bei der Schmerzübertragung und bei der Steuerung von Entzündungsprozessen spielt⁽¹⁴⁾. Russische Wissenschaftler beschrieben 2004, dass Fische auf Verletzungen mit Lautgebungen reagieren, die sie über ihre Schwimmblase erzeugen. Außerdem besitzen Fische über den gesamten Körper verteilt ein System von Schmerzrezeptoren, sogenannte Nozizeptoren. Am empfindlichsten reagieren sie an der Schwanzflosse, an den Rücken- und Brustflossen, an der Haut um die Augen herum und am Riechsack, dem Geruchsorgan der Fische⁽¹⁵⁾. Andere Wissenschaftler fanden am Kopf der Regenbogenforelle 22 Schmerzrezeptoren⁽¹⁶⁾. Es gibt auch Untersuchungen, nach denen sich Fische an einmal erlittene Pein erinnern können⁽¹⁰⁾. Wie empfindsam die Tiere sein können, haben aktuell amerikanische Wissenschaftler z. B. beim Engel-Antennenwels untersucht. Die Bauchflossen verfügen über feine Mechanorezeptoren ähnlich denen der menschlichen Fingerspitzen⁽¹⁷⁾.

Leid: Keine klare Definition

Rechtlich sowie wissenschaftlich ist jedoch nicht klar definiert, was unter „Schmerz“ und „Leid“ zu verstehen ist. Schmerzen definieren Wissenschaftler als „unangenehme sensorische und emotionale Erfahrungen im Zusammenhang mit einer tatsächlichen oder potenziellen Schädigung“ (GV-SOLAS 1995 in Alzmann 2016, S. 107). Auch das deutsche Tierschutzrecht bleibt in der Frage sehr schwammig: Darin gehören zum Leiden „alle nicht im Begriff des Schmerzes umfasste Beeinträchtigungen des Wohlbefindens, die über ein schlichtes Unbehagen hinausgehen (Maisack 2007 in Alzmann 2016)⁽¹⁸⁾.



Eine Gruppe freilebender Karpfen in einem Gewässer.

Foto: xperiarch, Fotolia.com

Diabetes-Versuche mit Zebrafischen

Dem kleinen Zebrafisch wird seine ungewöhnliche Fähigkeit zur Regeneration zum Verhängnis: Da er in der Lage ist, seine Rückflosse nach Verletzungen neu zu bilden, wird er in Versuchen zur Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus Typ 1) eingesetzt. Nachdem im Zebrafisch künstlich ein Diabetes erzeugt wurde, wird untersucht, ob dadurch seine Regenerationsfähigkeit beeinträchtigt wird, ähnlich wie es bei den Wundheilungsstörungen bei Diabetespatienten der Fall ist.

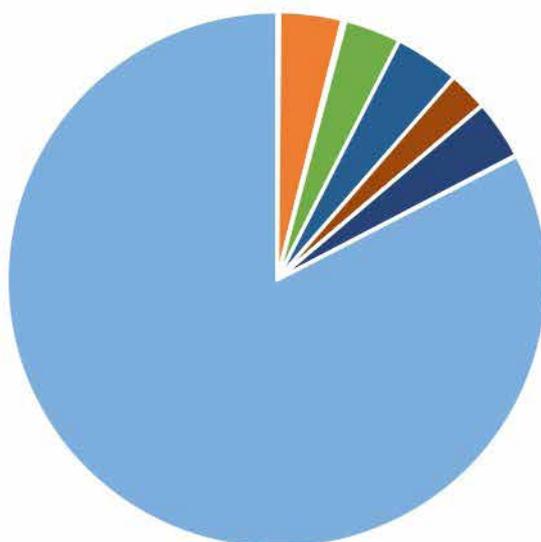
Beim Diabetes mellitus werden die Insulin produzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse zerstört. Dies wird künstlich beim Zebrafisch nachgestellt. Dazu werden die Fische mehrmals mit 2-Phenoxyethanol-haltigem Wasser betäubt und ihnen dann eine Streptozocin-Lösung in die Bauchhöhle injiziert. Streptozocin ist spezifisch toxisch (giftig) für die insulinproduzierenden Betazellen in den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse – deswegen wird es zur künstlichen Auslösung eines Diabetes mellitus genutzt. Erst in der 4. Woche beginnen die eigentlichen Versuche^(19, 20). Bedingt durch die Zerstörung der Beta-Zellen leiden die Fische in der Folge unter Diabetes-bedingten Netzhauterkrankung des Auges (Retinopathien) und Nierenerkrankungen (Nephropathien).

Rückenflossen werden amputiert

Bei den eigentlichen Versuchen werden die Zebrafische wiederum betäubt und die Rückflosse mit einem sterilen Skalpell amputiert. Dies wird gemacht, um zu untersuchen, ob der künstlich erzeugte Diabetes die Fähigkeit zur Regeneration beeinträchtigt. Im Normalfall sind die Tiere in der Lage, die Rückflosse neu zu generieren. Durch den Diabetes kommt es zu einer Verschlechterung der Flossenregeneration. Die Regenerationsfähigkeit wird fotografisch dokumentiert. Eine Computersoftware berechnet das Regenerationsvermögen. Bei den Zebrafischen, die trotz der Behandlung mit Streptozocin in der Lage waren, die Rückflosse vollständig zu regenerieren, wird die Flosse nach einer bestimmten Zeit ein zweites Mal amputiert⁽¹⁹⁾. Am Ende der Versuche werden die Tiere getötet.

Tierversuche mit Zebrafischen in der Grundlagenforschung

Humanerkrankungen und Tierverhalten/Biologie
(Anzahl beantragte Fische, Quelle: Animaltestinfo)



- Onkologie
- Kardiovaskul. System (Blut- u. Lymphgefäße)
- Nervensystem
- Atmungssystem
- Gastrointestinales System, inkl. Leber
- Muskuloskelettales System
- Immunsystem
- Urogenitales System/Stoffwechsel
- Sinnesorgane (Haut, Augen, Ohren)
- Endokrines System/Stoffwechsel
- Multisystemisch
- Ethologie, Tierverhalten, Tierbiologie
- Andere

Fluoreszierende Zebrafische zur Erforschung von Gefäßschäden

Bei Patienten mit Diabetes mellitus entsteht das sogenannte Methylglyoxal als Nebenprodukt von Stoffwechselfvorgängen. Es führt zu Gefäßschäden, die u. a. Diabetes-bedingte Netzhaut-erkrankungen des Auges und Nierenerkrankungen nach sich ziehen. Um die Wirkweise dieser Zuckerablagerungen besser zu verstehen, werden Zebrafischembryonen eingesetzt, bei denen künstlich Gefäßschäden durch hohe Glucose und Methylglyoxal-Konzentrationen erzeugt werden. Für diese Untersuchung werden die Fische zuvor gentechnisch verändert (Bezeichnung: tg(fli1:EGFP))^(21, 22). Dazu wird ihnen im Ein-Tages-Stadium ein DNA-Fragment injiziert, damit sie während der Embryonalentwicklung in allen Blutgefäßen ein Fluoreszenzprotein (EGFP) produzieren, das mit einem speziellen Lichtmikroskop erkennbar wird. Damit werden die Fehlbildungen bei der Gefäßentwicklung durch Ablagerungen am lebenden Organismus beobachtet⁽²³⁾.



Fluoreszenz durch gentechnische Veränderung: Links und rechts eine grün fluoreszierende Maus unter UV-Licht. In der Mitte eine Maus ohne Grünfluoreszierendes Protein (GFP).

Quelle: Ingrid Moen, Charlotte Jevne, Jian Wang, Karl-Henning Kalland, Martha Chekenya, Lars A Akslen, Linda Sleire, Per Ø Enger, Rolf K Reed, Anne M Øyan and Linda EB Stuhr: Gene expression in tumor cells and stroma in dsRed 4T1 tumors in eGFP-expressing mice with and without enhanced oxygenation. In: *BMC Cancer*. 2012, 12:21. doi:10.1186/1471-2407-12-21, PDF.

Künstlich erzeugt: Herzmuskelerkrankungen bei Zebrafärbliingen

Trotz anatomischer Unterschiede zwischen Säugetier- und Zebrafischherz verwenden Forscher Zebrafische, um die genetischen Mechanismen angeborener Herzerkrankungen des Menschen zu untersuchen⁽²⁴⁾. Über die zellulären Mechanismen verschiedener Herzmuskelerkrankungen ist wenig bekannt. Daher werden diese Erkrankungen auf genetischer Ebene beim Menschen ermittelt. Diese Genveränderungen werden dann künstlich beim Tier hergestellt, indem sie in die DNA des Fischembryos eingebaut werden. Das Tier entwickelt sich dann mit dem genetischen Schaden. Während ihrer Entwicklung sind die Zebrafische durchsichtig. Die Forscher nutzen dies und beobachten mit Hilfe von Fluoreszenztechniken die Entwicklung der Erkrankung am lebenden Tier.

Verletzte Herzen und Hitzeschocks

Auch Zebrafärbliinge verfügen über ein beachtliches Regenerationsvermögen. Sie können sogar eine Verletzung am Herzen regenerieren. Inzwischen wurde ein molekularer Mechanismus aufgedeckt, der bei den Fischen für die Regeneration sorgt⁽²⁵⁾. Ein Signalprotein an den Wundrändern macht es möglich. Um diese Erkenntnisse zu gewinnen, wurden verschiedene gentechnisch veränderte Fischlinien im Alter von 4 bis 18 Monaten und 8 bis 9 Wochen verwendet und mit einem in flüssigem Stickstoff gefrorenen Kupferfaden am Herzen so verletzt, dass Gewebe abstarb (sogenannte Cryoinjury)^(26, 27). Um bei anderen transgenen Fischen eine durch Hitzeschock ausgelöste Reaktion des Gewebes zu bewirken, wurden die Fische für eine Stunde in 37° warmes Wasser gesetzt und danach die Wassertemperatur wieder auf 27 °C reduziert. Dies sollte den Selbstheilungsmechanismus blockieren. Eine Teilgruppe wurde nach fünf Stunden getötet und die Herzen entnommen. Bei einer anderen Teilgruppen wurden die Hitzeschockexperimente mehrfach wiederholt. Danach wurden auch diese getötet und untersucht.

Die Hälfte der Fische sterben in akuten Giftigkeitstests

Auch in der regulatorischen Toxikologie, d.h. bei gesetzlichen vorgeschriebenen Giftigkeitsprüfungen, werden Fische eingesetzt. In der Ökotoxikologie sind Fische immer noch wesentlicher Bestandteil der Prüfzenarien. Um beispielsweise das toxische Potential von chemischen Ausgangsstoffen, Fertig- und Zwischenprodukten, Pestiziden, Bioziden, Nahrungsmittelzusatzstoffen oder Duftstoffen zu untersuchen, wird z. B. der akute Giftigkeitstest durchgeführt. Dazu werden Zebrafische der Prüfsubstanz ausgesetzt. Vor dem Versuch erfolgt eine sogenannte Dosisfindungsstudie, um die Test-Konzentrationen auswählen zu können. Untersuchungsziele sind die akute letale (tödliche) Toxizität, also die Konzentration im Wasser, die 50 Prozent einer Prüfgruppe von Fischen innerhalb einer bestimmten Wirkungsdauer tötet. Die Fische werden der dem Wasser zugesetzten Prüfsubstanz für einen längeren Zeitraum mit wechselnden Konzentrationen ausgesetzt. Die Todesfälle werden mindestens alle 24 Stunden erfasst. Soweit möglich, werden bei jeder Beobachtung auch die Konzentrationen berechnet, die 50 Prozent der Fische töten (LC50-Test). Auch die überlebenden Tiere werden nach dem Versuch getötet⁽²⁾.

Leidensreduzierung: Fischembryos statt ausgewachsene Fische

Es gibt mittlerweile mehrere Verfahren, die ohne ausgewachsene Fische auskommen: Dies sind der Fischembryo-Toxizitätstest (FET) (OECD Testrichtlinie 236), der kurzfristige Giftigkeitstest am Embryo und Dottersackstadien (OECD 212), der Early Life Stage-Test mit Fischlarven (OECD 210) und der sogenannte „Fischeitest“ (DIN 2001), bei dem statt ausgewachsenen Fischen die frisch befruchteten Eier des Zebraäbblings in der Abwasseruntersuchung eingesetzt werden. Da Larven gegenüber Chemikalien sehr empfindlich sind, gelten diese Tests als gut geeignet zur Vorhersage des gesamten Lebenszyklus. Zu den frühen Entwicklungsstadien zählen das befruchtete Ei, verschiedene Embryonalstadien, die Larve, die sich noch vom Dottersack ernährt (Eleutheroembryo) und die freischwimmende Larve, die sich selbst ernährt. Die Giftigkeit wird anhand der Schädigung des Embryos gemessen, sowie der Schlüpftrate der Larven, der Mortalität sowie anhand von Wachstum und möglichen Deformationen. Diese Ersatzmethoden zum ausgewachsenen Fisch werden in der Fachwelt begrüßt. Doch sie bergen ein moralisches Dilemma: Unter tierethischen Gesichtspunkten ist diese Methode nicht wirklich tierversuchsfrei, weil hier noch immer ein lebendes Tier eingesetzt wird. Dennoch tragen sie zur Leidensreduzierung bei. Fischembryonen werden als Ersatz oder Methodenverfeinerung betrachtet, da vermutet wird, dass die Entwicklungsstadien wahrscheinlich keine oder weniger Schmerzen, Leiden, Stress oder nachhaltige Schäden erleiden^(28, 29). Insofern handelt es sich hier um eine Verfeinerung des Tierversuchs mit dem Ziel, das Leid der „Versuchstiere“ zu reduzieren.

Fischembryotest gilt nicht als Tierversuch

Obgleich es sich um lebende Organismen handelt, gilt der Fischembryotest FET nach der EU-Tierversuchsrichtlinie nicht als Tierversuch. Die Regulierungsbehörden haben einheitlich festgelegt, dass frühe, noch nicht „freilebende“ Entwicklungsstadien von Fischen als nicht geschützt eingestuft werden. Darunter fallen demnach auch alle Stadien, die sich noch nicht unabhängig ernähren können. Beim Zebraäbbling wurde erst deutlich später als 120 Stunden nach Befruchtung der Eier eine aktive externe Nahrungsaufnahme beobachtet. Daher werden Experimente mit dem Zebraäbbling bis zu einem Alter von 5 Tagen nicht als Tierversuch betrachtet und auch nicht in der Tierversuchstatistik erfasst⁽²⁸⁾.

Problem: Fischembryotest wird nicht von allen Behörden anerkannt

Der Fischembryotest (OECD Testrichtlinie 236) ist seit 2013 zwar eine anerkannte Alternativmethode zu Versuchen mit ausgewachsenen Fischen (OECD Testrichtlinie 203). Für diese akuten 5-Tage-Toxizitätstests ist der Embryotest jedoch nur als Alternative und nicht als Ersatz anerkannt⁽³⁰⁾. Deswegen führen viele Hersteller weiterhin Tests an ausgewachsenen Fischen durch, wie u. a. den 5-Tage-Toxizitätstest an Fischen (nach OECD Testrichtlinie 203), die verlängerte Giftigkeitsstudie am Fisch (OECD Testrichtlinie 204), den 28-tägigen Jungfischwachstumstest nach OECD Testrichtlinie 215) oder den Sexualorgan-Entwicklungstest (nach OECD Testrichtlinie 234). Bei Hinweisen auf Nervengiftigkeit insbesondere bei der Pestizidherstellung fordert auch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (Efsa), dass ein Fischtest durchgeführt wird. Um diese Tests am adulten Fisch beenden zu können, arbeiten Wissenschaftler derzeit an der Entwicklung eines Vergleichstests, um die Aussagefähigkeit des Embryotests als Alternative zum Fischtest noch weiter zu auszubauen.



Fischlarventest in einem Forschungsinstitut

Foto: anyaivanova, istockphoto.com

Fischembryotest auf dem Prüfstand

Derzeit läuft eine Gutachtenbewertung im Auftrag der EU-Chemikalienagentur. Bisherige Abgleiche von mehr als 300 Substanzen gegen den Fischtest (OECD 203) haben gezeigt, dass die Ergebnisse zu 95 Prozent übereinstimmten. Die Industrie – auch in den USA – ist am Fischembryotest interessiert und nutzt ihn in der Routineprüfung. Der Test ist weitaus kostengünstiger als der konventionelle Fischtest. Nur, wenn es um die Chemikalienregulierung geht, ist man in den USA zurückhaltend und verlangt den Fischtest. Da auch deutsche Hersteller ihre Produkte in den USA vermarkten wollen, führen sie nicht selten den Fischtest auf der Grundlage der Anforderungen der US-amerikanischen Umweltbehörde (EPA) durch.

Fische in Langzeit-Giftigkeitstests

Fische kommen auch im Bereich der Langzeit-Giftigkeitstests (Langzeittoxizität) zum Einsatz. Zum Beispiel beim sogenannten „Extended One Generation Reproduction Test“ (OECD Testrichtlinie 240). Dabei werden Reiskärpflinge (Medaka) über mehrere Generationen einer Substanz ausgesetzt. Dabei werden die Effekte einer Chemikalie auf mehrere Generationen des Reiskärpflings untersucht. Brütende Paare werden der Substanz im Wasser ausgesetzt. Hiernach wird die Fruchtbarkeit (Anzahl gelegter Eier) und gesondert Schlupf und Überleben der Nachkommen sowie deren Entwicklungsuntersucht. Die Tiere werden danach wieder in Paaren zusammengesetzt, das Reproduktionsverhalten beobachtet und wiederum die Anzahl gelegter Eier, Schlupfrate und Überlebensfähigkeit der Larven ermittelt. Tote Eier werden entfernt. Alle Tiere werden nach dem Versuch getötet, gewogen und vermessen. Zudem werden Leber, Niere und Geschlechtsorgane entnommen und untersucht.

Fische werden über 28 Tage einer giftigen Substanz ausgesetzt

Ein weiteres Beispiel ist der „Juvenile Growth Test“ (OECD 215). Dieser Langzeit-Giftigkeitstest dauert 28 Tage. Hier werden Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) über einen längeren Zeitraum einer potenziell giftigen Substanz ausgesetzt. Danach wird die Auswirkung der Chemikalie auf das Wachstum der Jungfische untersucht. Ermittelt werden soll die geringste Testkonzentration, bei der das Wachstum der Fische noch signifikant beeinträchtigt wird⁽³¹⁾. Für den „Juvenile Growth Test“ gibt es noch kein anerkanntes tierversuchsfreies Verfahren.

Lichtblicke: Giftigkeitsprüfungen ohne Fische

Verschiedene Wissenschaftlerteams haben in den letzten Jahrzehnten versucht, den akuten Fischtest (OECD 203) durch Fischzelllinien zu ersetzen^(32, 33). Bereits 1985 wurden in Kanada Zellkulturen beispielsweise aus Leberzellen der Regenbogenforelle entwickelt^(34, 35).

Ein neues Verfahren ist das des Schweizer Wasserforschungsinstituts EAWAG. Die Methode auf Basis von Kiemenzellen ist in ihrer Vorhersagefähigkeit für die akute Fischtoxizität mit dem Fischembryotest vergleichbar. Dieser Test hat einen entscheidenden Vorteil zum Leberzelltest: Die Kiemen sind gute Anzeiger für Chemikalien im Wasser. Schädigungen lassen sich durch Messungen der Vitalfunktionen dokumentieren, beispielsweise die Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung der Kiemenzellen. Die Auswertung der Messungen lässt eine Beurteilung der Sterblichkeitsrate der Fischzellen zu. Wie beim Fischtest wird die Konzentration bestimmt, bei der 50 Prozent der Zellen sterben. Bei Untersuchungen hat sich jedoch herausgestellt, dass die Zelllinie für einige Substanzen nicht empfindlich genug ist (36). Derzeit läuft eine internationale Ringstudie in verschiedenen Laboratorien in Europa und den USA zur Untersuchung von Robustheit und Vergleichbarkeit der Methode. Sobald die Ergebnisse der Studie vorliegen soll das Verfahren auf EU- (EURL-ECVAM) und internationaler Ebene (OECD) behördlich anerkannt werden⁽³⁷⁾.

Kombination von Zelllinien dokumentiert Erbgutveränderungen

Neben der Kiemenzelllinie RTgill-W1 nutzen die Schweizer Wissenschaftler auch die Leberzelllinie (RTL-W1) und die Darmzelllinie der Regenbogenforelle (RtgutGC)^(38, 39). Für Tests, die die Wirkungen von Stoffen aus oberflächlichen Sedimentschichten von Gewässern auf das Erbgut von Zellen untersuchen (Mutagenitätsstudien), hielten Forscher z. B. die Fisch-Leberzelllinie geeignet sowie den Ames-Test, ein Rückmutationstest (Punkt- oder Genmutation) mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium*. Sie empfehlen jedoch die Kombination aus beiden Tests, da die beiden Zelllinien unterschiedliche Mutationsereignisse, also Veränderungen des Erbgutes, dokumentieren können⁽⁴⁰⁾.

Zellen dokumentieren Wirkung schädlicher Metalle

Weitere Zelllinien, die für bestimmte Fragestellungen im Bereich der akuten Giftigkeit genutzt werden, sind die Kiemenzellen (Primäre Kiemenepithelzellen (FIGCS)), mit denen vor Ort in den Gewässern ökotoxikologische Tests durchgeführt werden können^(41, 42). Allerdings werden die Zellen von frisch getöteten Forellen entnommen⁽⁴³⁾. Diese Zellen sind in der Lage, bioreaktive Metalle in Flussfeldversuchen aufzuspüren. Dies sind Metalle, die negativen Ein-



Trinkwassergewinnung in Deutschland erfolgt nicht nur über Grundwasser, sondern auch aus Flusswasser. Blick auf die Wassergewinnungsanlage in Essen-Burgaltendorf an der Ruhr.

Foto: Maschinenjunge

fluss auf Lebewesen in ihrer Umgebung haben können. Die Primärzellen sind für Bioverfügbarkeits- und Giftigkeitsuntersuchungen in natürlichen Lebensräumen geeignet⁽⁴⁴⁾ und sind als Ersatz für die Giftigkeitstests am Fisch, für Bioakkumulationsstudien sowie für Wasserqualitätsmonitorings nutzbar⁽⁴⁵⁾.

Fischvirus: Zellen ermöglichen Untersuchung

Eine weitere Zelllinie (PLHC-1) aus dem Leberkarzinom eines Zahnkarpfens, eignet sich für die Umweltbeobachtung⁽⁴⁶⁾. Aus der Rückenflosse des Reiskärpflings wurde eine Zelllinie (OLHNI-2) gewonnen, mit der 2010 ein Fischvirus untersucht werden konnte⁽⁴⁷⁾. Weitere Zelllinien stammen aus den Epithelzellen (FHM) der Elritze, aus dem Keimdrüsengewebe (RTG-2) der Regenbogenforelle, aus dem Gewebe (BF-2) von Jungfischen des Blauen Sonnenbarschs sowie aus dem Bindegewebe (Fibroblasten) des Goldfisches. Letztere kann die zellschädigende Wirkung von Chlorphenolen (Chlorkohlenwasserstoffe) bestimmen⁽⁴⁸⁾. In einem anderen Forschungsprojekt (CELLSens-Eco8) wurde eine Strategie zur Vorhersage von direkt tödlich wirkenden industriellen organischen Chemikalien entwickelt. Diese basiert auf Fisch-Zelllinien und Zebraäbrblingsembryonen⁽⁴⁹⁾.

EU fordert Nutzung mehrerer Ansätze

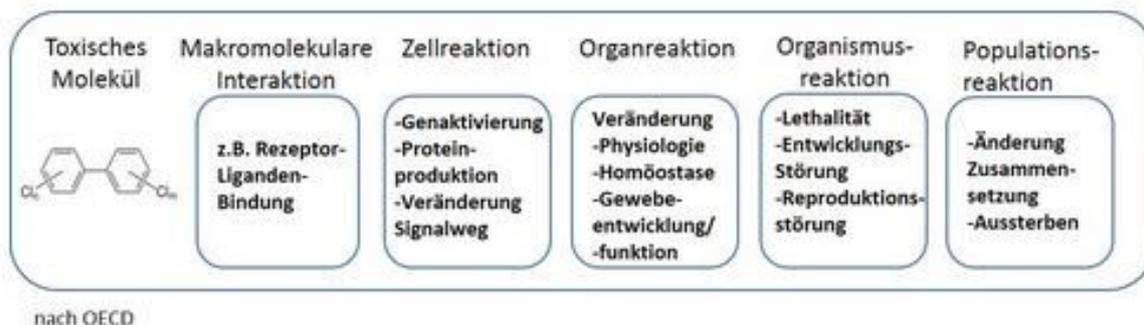
Die europäische Validierungsbehörde ECVAM, die für die Anerkennung neuer Verfahren als Ersatzverfahren zum Tierversuch zuständig ist, hat in ihrem Statusbericht für 2015 drei tierversuchsfreie Verfahren zu Giftigkeitstests an Fischen beurteilt und hat einen Strategieplan vorgelegt, wie die Tierversuche minimiert oder vermieden werden können⁽³⁷⁾. Darunter fiel ein Test auf zellschädigende Wirkung auf Basis einer Fischzelllinie (Kiemenzelllinie der regen-

bogenforelle RTgill-W1) und sogenannte „Adverse Outcome Pathways“ (AOPs) für den Bereich der Langzeitgiftigkeitstests an Fischen. Unter AOPs versteht man Untersuchungen, über welche Wege und Mechanismen Chemikalien den Körper negativ beeinträchtigen können. Dazu betrachtet man den schädigenden Einfluss beginnend mit der molekularen Ebene, über die Zellebene, das Organ, den gesamten Organismus bis hin zu einer ganzen Population⁽⁵⁰⁾. Verschiedene Forschungsgruppen arbeiten an der Identifizierung und Beschreibung dieser „AOPs“ für die chronische Fischtoxizität. Dazu beobachten sie frühe Entwicklungsstadien wie Embryos und Larvenstadien mit dem Ziel, eine Toolbox mit relevanten AOPs und dazu passende, auf dem FET basierende, Tests zu entwickeln, um diese AOP-Ereignisse erkennen zu können.

Ein weiteres Verfahren, das als "Treshold of Toxicological Concern" (TTC) bezeichnet wird, zielt darauf ab, das Expositions-niveau aller Chemikalien bestimmen zu können, unter dem kein spürbarer schädigender Effekt auftritt. Das Konzept wird bereits bei der Risikobewertung von Chemikalien bezüglich der Wirkung auf die menschliche Gesundheit eingesetzt und bei der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (Efsa) für die Risikobewertung von Rückständen in Lebensmitteln diskutiert. Hier wird das Konzept auf im Wasser beheimatete Lebewesen übertragen. Die Anwendung kann helfen, Giftigkeitstests mit Fischen zu vermeiden⁽⁵¹⁾.

Einsatzmöglichkeiten von Zellinientests werden überprüft

Unter Berücksichtigung des gegenwärtigen Stands der Technik schlägt die Validierungsbehörde vor, dass u.a. zur Identifizierung und Klassifizierung der akuten und chronischen Fischtoxizität eine Vielzahl an Ansätzen genutzt werden sollte, um den Tierversuch zu minimieren oder besser zu vermeiden⁽⁵²⁾. Dazu sollen mehrere OECD-Testrichtlinien überarbeitet bzw. überprüft werden. Außerdem sollen die Einsatzmöglichkeiten von Zellinientests untersucht und validiert werden. Zudem soll der Zebrafisch Embryotoxizitätstest, der TTC-Ansatz sowie die Anwendung des AOP-Konzepts vorangetrieben werden. Weitere Maßnahmen sind die Eruierung der Möglichkeiten, wie das Waiving-Prinzip. Dieses könnte den Verzicht auf den Tierversuch mit Fischen ermöglichen, wenn Informationen für vergleichbare Substanzen oder Moleküle bereits vorliegen. Weiterhin setzt die Zulassungsbehörde auf den Einsatz weitere Modelle zur Vorhersage der Bioakkumulation (Anreicherung einer Substanz im Organismus), die Verbesserung von computerbasierten Vorhersagemodellen und die Entwicklung einer OECD-Testrichtlinie für eine in-vitro-Leberstoffwechseluntersuchung.



Diese Maßnahmen sind bereits in der Umsetzung: Neben Ringstudien zur Überprüfung der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit von Zellkulturen konnten Wissenschaftler in einer aktuellen Forschungsarbeit mit einem Computermodell belegen, dass untersuchte Chemikalien während der verschiedenen Lebensstadien des Fisches (Embryo-Larve-ausgewachsener Fisch)

die gleichen Toxizitätsmechanismen aktivieren. Die Befunde stützen das Argument, dass der Fischembryotest eine geeignete Alternative für den akuten Fischtest ist⁽⁵³⁾. Eine Überarbeitung der Richtlinie 203 (akuter Fischtoxizitätstest) begann im September 2014⁽⁵⁴⁾.

Ferne Zukunftsvision: Fish-on-a-Chip

Ein Lösungsansatz könnte analog zum Human-on-a-Chip der Fish-on-a-Chip sein. Doch eine Kombination einzelner Fischorgane in Miniaturform auf einem Chip gibt es noch nicht. Schweizer Wissenschaftler haben jedoch einen Anfang gemacht: Mit einem Organ-on-a-Chip mit Fischdarmzellen werden Expositions- und Transportphänomene untersucht sowie physiologische Stressfaktoren und das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen. Die in-vitro-Zellmethoden sind aber derzeit noch nicht validiert. Momentan laufen Machbarkeitsstudien im Rahmen von Doktorarbeiten⁽⁵⁵⁾. 2014 stellten zudem chinesische Wissenschaftler einen Zebrafish-on-a-Chip für Giftigkeitstests und Untersuchungen von fruchtschädigenden Effekten vor. Allerdings nutzten sie Embryos und Larven vom Zebrafisch zur Bewertung der Auswirkungen eines Asthmamittels⁽⁵⁶⁾. In ferner Zukunft wird es möglich sein, mithilfe der Chiptechnologie spezielle Fragestellungen zu beantworten. Der grundsätzliche Ersatz von Tierversuchen durch Chips im Hochdurchsatzverfahren liegt im Bereich der aquatischen Toxikologie jedoch noch in weiter Ferne. Zu viele komplexe Stoffwechselfunktionen in und zwischen den verschiedenen Organen müssen noch geklärt werden.

Softwareprogramme ergänzen Zelltests

Es gibt einige frei verfügbare Softwareprogramme, um die Eigenschaften von Chemikalien zu beurteilen. Mit ihnen lässt sich eine mögliche Giftigkeitswirkung im Wasser vorhersagen. Diese Vorhersagemodelle reichen zwar alleine nicht aus, doch sie können den FET und die in-vitro-Zelltests ergänzen.

Abwassertests: Fischeier statt Goldorfen

Für Routineuntersuchungen von Abwässern werden weltweit Fische eingesetzt. Vor 2003 wurde in Deutschland für die Ermittlung der potentiellen Toxizität von Abwässern der sogenannte akute Fischtest mit Goldorfen genutzt. Seit 2004 wurde dieser Test für die Bestimmung der Abwassertoxizität durch den sogenannten „Fischeitest“ (DIN 2001) mit Fischeiern des Zebraäbrblings ersetzt. Hierbei wird die Embryonalentwicklung der Zebrafische während der ersten Stunden nach der Befruchtung des Eies beobachtet. Die Methode wurde vom Bundesverband Menschen für Tierrechte bereits beim ersten Versuchstier des Jahres 2003 vorgestellt⁽⁵⁷⁾. Der Abwassertest geht auf die Initiative des Umweltbundesamtes zurück⁽⁵⁸⁾.

Längerfristige Tests ohne Fischeinsatz

Das Schweizer Wasserforschungsinstitut EAWAG hat eine in-vitro-Testmethode entwickelt, bei der die Teilungsgeschwindigkeit von Kiemenzellen der Regenbogenforelle gemessen und mit einem Computermodell auf den gesamten Fisch hochgerechnet werden kann⁽⁵⁵⁾. Derzeit kann jedoch noch nicht beurteilt werden, ob sich die Kiemenzellen als „Indikatoren“ für alle Gewebe im Fisch bewähren. Die Forscher hoffen, dass das Verfahren zukünftig die langfristi-

gen Tierversuche zum Fischwachstum (OECD Testrichtlinie 215) ersetzen kann. Die Schweizer Wissenschaftler versuchen zudem, das Fischwachstum mittels eines in-vitro-Tests vorherzusagen. Die Zelltests sind dabei direkt mit Computermodellen verknüpft.

Humane Krankheitsmodelle statt genmanipulierte Fische

Anstelle von Tiermodellen können heute auch humane Krankheitsmodelle in der Petrischale erzeugt werden. Wie bei den gentechnischen Veränderungen beim Tier kann dafür ebenfalls die CrispR/Cas9-Methode genutzt werden. Das wichtigste Ziel von in-vitro-Krankheitsmodellen ist es, ein tieferes Verständnis in die Krankheitsursachen zu gewinnen, um neue oder verbesserte Therapien zu entwickeln. Es gibt mittlerweile unzählige Krankheitsmodelle in der Petrischale für die Organe Herz, Lunge, Darm, Leber und Nieren. Weitere Modelle eignen sich für die Untersuchung der Blutbildung, der Gefäße, des Hormonhaushaltes, des Skeletts und des Nervensystems. Hinzu kommen Knorpelerkrankungsmodelle, Hauterkrankungsmodelle und Modelle der verschiedensten Infektions- und Krebserkrankungen⁽⁵⁹⁾.

Ausblick: Nötig sind Investitionen und Kombinationsverfahren

Beim Fisch wird der kontinuierliche Anstieg der Tierverbrauchszahlen im Bereich der gentechnischen Veränderung besonders deutlich. Dies zeigt – nicht nur für den Fisch – die Dringlichkeit eines Verbotes von Patenten auf Tiere sowie den Schutz der genetischen Integrität von Lebewesen. Dabei bieten humane Krankheitsmodelle ein großes Potential, um Krankheiten des Menschen zu untersuchen. Die Zukunft in der Grundlagenforschung muss deswegen heißen: Menschliche Krankheitsmodelle statt genmanipulierte Tiere.

Betreffend des Entwicklungsstandes der tierversuchsfreien Methoden lässt sich sagen, dass bereits diverse Bausteine an Verfahren zur Verfügung stehen. Bewährt hat sich zweifelsfrei der Fischembryotest. Laufende Untersuchungen bestätigen seine Aussagefähigkeit insbesondere als Alternative für den akuten Fischtest. Zudem ist die Industrie an dem vergleichsweise kostengünstigen Embryotest interessiert, was dem Verfahren weiteren Auftrieb geben wird. Doch der Test an Embryonen birgt ein moralisches Dilemma: Unter tierethischen Gesichtspunkten ist diese Methode nicht wirklich tierversuchsfrei, weil hier noch immer lebende Tiere eingesetzt werden. Fest steht jedoch, dass er zur Leidensreduzierung beiträgt, solange es noch keine anderen Verfahren gibt.

Ein vielversprechender Bereich sind Zellinientests, wie beispielsweise das Verfahren des Schweizer Wasserforschungsinstituts EAWAG, das auf Basis von Kiemenzellen arbeitet. Aus tierethischer Sicht sind diese Verfahren auch teilweise problematisch, da für die Gewinnung der Zellen auch Tiere sterben müssen. Aber sie tragen zu einer erheblichen Leidensreduzierung bei, da nicht mehr am lebenden Tier getestet wird. Deswegen ist zu hoffen, dass die derzeit laufende internationale Ringstudie positive Ergebnisse bringt und die Methoden möglichst schnell behördlich anerkannt werden.

Das größte Potenzial zur Ablösung der qualvollen Fischtests liegt in der Kombination verschiedener Methoden. Insofern ist die Strategie der EU-Zulassungsbehörde ECVAM zielführend, die auf eine Verknüpfung unterschiedlicher Verfahren setzt. Vielversprechend sind u.a. Zellinientests, der Fischembryotest, die „Adverse Outcome Pathway“ (AOPs) für den Bereich der Langzeitgiftigkeitstests an Fischen und das Konzept des "Threshold of Toxicological Concern". Damit die Kombinationen verschiedener Verfahren in der Praxis ankommen und zur Ablö-

sung des Tierversuchs beitragen, fordert der Bundesverband, die Validierung und Anerkennung von sogenannten integrierten Teststrategien und ggfs. damit verbundener Messgeräte, wenn einzelne Methoden als Ersatz zum Tierversuch nicht ausreichen. Eine weitere wichtige Maßnahme ist die Streichung der Tierversuchsverfahren aus den Prüfvorschriften, sobald ein tierversuchsfreies Verfahren aufgenommen wird und die zwingende Anwendung dieser Methode.

Um die Entwicklung neuer sowie den Ausbau und Kombination vorhandener tierversuchsfreier Methoden zu beschleunigen, muss jedoch noch erhebliche Forschungsarbeit geleistet werden. Dazu muss deutlich mehr Forschungsförderung in die Entwicklung dieser Verfahren fließen. Darüber hinaus ist die Etablierung weiterer Lehrstühle für tierversuchsfreie Methoden, ein Ausbau der Förderung von Nachwuchswissenschaftlern, die Unterstützung potenzieller Methoden bis zu ihrer Anerkennung sowie schnelle Anerkennungsverfahren auf europäischer und internationaler Ebene notwendig. Denn die behördlichen Anerkennungsverfahren dauern mit 6 bis 15 Jahren immer noch viel zu lang.

Weitere zielführende Maßnahmen für einen Paradigmenwechsel hin zu einer tierversuchsfreien Zukunft hat der Bundesverband in einem umfangreichen Maßnahmenkatalog zusammengestellt.

Rechtsgrundlagen für Tierversuche an Fischen

Rechtsgrundlagen für die Zulassung von Tierversuchen für Pflanzenschutzmittel, Industriechemikalien, Biozide und Veterinärarzneimittel.

- OECD 203 Akuter Toxizitätstests an adulten Fischen: 5-Tage-Studie
- OECD 204 Verlängerte Toxizitätsstudie am Fisch: 14-Tage-Studie (gestrichen)
- OECD 210 Early-Life Stage Toxicity Test
- OECD 212 Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages
- OECD 215 Fish, Juvenile Growth Test
- OECD 229 Fish Short Term Reproduction Assay
- OECD 230 21-day Fish Assay zum Test auf Östrogen-/Androgenaktivität sowie Aromatase-Hemmung
- OECD 234 Fish Sexual Development Test
- OECD 240 Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)
- OECD 305 Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure

- REACH-Verordnung 440/2008 und 1907/2006 EG
- Chemikaliengesetz sowie
- Pflanzenschutzmittel Verordnung 2009/1107/EG

Ersatz:

- OECD 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

Außereuropäisch:

- EPA OPPTS 850.1400
- EPA OPPTS 850.1075 zur Prüfung von Pestiziden auf ihre Wirkung auf aquatische Ökosysteme

Quellen und Literatur:

- (1) BMEL Versuchstierstatistik 2014. http://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?docId=7027766
- (2) Bundesinstitut für Risikobewertung: AnimalTestInfo-Datenbank zu Tierversuchsvorhaben in Deutschland. www.animaltestinfo.de
- (3) Kim, D., Kim, S., Kim, S. et al. (2016): Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Research*. <http://genome.cshlp.org/content/early/2016/01/27/gr.199588.115>
- (4) <http://www.berliner-zeitung.de/kultur/veganer-kolumne--meine-tiere--bedenkenloses-aufschlitzen-von-fischen,10809150,33690486.html>
- (5) <http://www.fishpain.com/fish-and-pain-intelligence.htm>
- (6) Bshary, R., Hohner, A., Ait-el-Djoudi, K. & Fricke, H. (2006): Interspecific Communicative and Coordinated Hunting between Groupers and Giant Moray Eels in the Red Sea. *PLOS Biology* 4/12: 2393-2398. <http://www.plosbiology.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pbio.0040431&representation=PDF>
- (7) <http://www.welt.de/wissenschaft/article12068006/Fische-sind-intelligent-nicht-nur-im-Schwarm.html>
- (8) Mason, M. (2011): Wild fish show smashing skills in using tools. *The Sydney Morning Herald*. <http://www.smh.com.au/environment/animals/wild-fish-show-smashing-skills-in-using-tools-20110914-1k974.html>
- (9) Gómez-Laplaza, L. M. & Gerlai, R. (2010): Can angelfish (*Pterophyllum scalare*) count? Discrimination between different shoal sizes follows Weber's law. *Anim Cogn* (2011) 14: 1–9. DOI 10.1007/s10071-010-0337-6
- (10) Yue, S, Moccia, R. D. & Duncan, I. J. H. (2004): Investigating fear in domestic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using an avoidance learning task. *Applied Animal Behaviour Science* 87: 343–354. <http://www.aps.uoguelph.ca/~rmoccia/RDM%20articles/Trout%20Fear-20Yue,%20Moccia,%20Duncan-2004.pdf>
- (11) Oetinger, F. C. (2003): Betäubung von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit Nelkenöl und BHA – Stressbelastung und Produktqualität. Inaugural-Dissertation München.
- (12) European Food Safety Authority (2009): SCIENTIFIC OPINION General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare *The EFSA Journal* 954, 1-27. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/ahaw_op_ej954_generalfishwelfare_en.pdf
- (13) Wild, M. (2012): Fische. Kognition, Bewusstsein und Schmerz. Eine philosophische Perspektive. Beiträge zur Ethik und Biotechnologie. Eidgenössische Ethikkommission für die Biotechnologie im Ausserhumanbereich EKAH und Ariane Willemsen, Bern.
- (14) http://flexikon.doccheck.com/de/Substanz_P
- (15) Chervova, L. S. & Lapshin, D. N. (2004): Pain sensitivity of fishes and analgesia induced by opioid and nonopioid agents. *Proceedings of The Fourth International Iran & Russia Conference*. <http://iirc.narod.ru/4conference/Fullpaper/50010.pdf>
- (16) Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A. & Gentle, M. J. (2003): Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 1115-1121.
- (17) Hardy, A. R., Steinworth, B. M. & Hale, M. E. (2016): Touch sensation by pectoral fins of the catfish *Pimelodus pictus*. *Proc. R. Soc. B* 283: 20152652. <http://rspb.royalsocietypublishing.org/>
- (18) Alzmann, N. (2016) Zur Beurteilung der ethischen Vertretbarkeit von Tierversuchen. Tübingen.
- (19) Intine, R. V., Olsen, A. S. & Sarras, M. P. (2013): A Zebrafish Model of Diabetes Mellitus and Metabolic Memory. *Journal of Visualized Experiments* 72. e50232. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485929>
- (20) <https://clinicaltrials.gov/search/intervention=streptozocin>
- (21) Lawson, N. D. & Weinstein, B. M. (2002): In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Developmental Biology* 248: 307–318. doi:10.1006/dbio.2002.0711. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160602907116>
- (22) Delova, V., Muth-Köhne, E., Schäfers, C. & Fenske, M. (2014): Transgenic fluorescent zebrafish Tg(fli1:EGFP) for the identification of vasotoxicity within the zFET. *Aquatic Toxicology* 150: 189–200.
- (23) Pohl, J. (2014): Einfluss von hoher Glukose und dem reaktiven Dicarbonyl Methylglyoxal auf die Angiogenese – Pilotuntersuchungen im Zebrafisch (*Danio rerio*). Dissertation Universität Heidelberg.
- (24) Chico, T. J. A., Ingham, P. W. & Crossman, D. C. (2008): Modeling Cardiovascular Disease in the Zebrafish. *TCM* Vol. 18/4: 150-155.
- (25) <http://www.uni-ulm.de/home/uni-aktuell/article/wenn-verletzte-herzen-wieder-wachsenbiologen-erforschen-herzregeneration-bei-zebrafishen.html>
- (26) Wu, C.-C., Kruse, F., Vasudevarao, M. D. et al. (2016): Spatially Resolved Genome-wide Transcriptional Profiling Identifies BMP Signaling as Essential Regulator of Zebrafish Cardiomyocyte Regeneration. *Developmental Cell* 36: 36–49. <http://www.cell.com/developmental-cell/abstract/S1534-5807%2815%2900795-9>
- (27) Schnabel, K., Wu, C.-C., Kurth, T. & Weidinger, G. (2011): Regeneration of Cryoinjury Induced Necrotic Heart Lesions in Zebrafish Is Associated with Epicardial Activation and Cardiomyocyte Proliferation. *PLOS One* 6/4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21533269>
- (28) Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H. and Braunbeck, T. (2011): Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments. - a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol*. 33: 128-132.

- (29) EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to the aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes (EFSA-Q-2004-105). *EFSA J* 2005;292:1–46.
- (30) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en
- (31) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-215-fish-juvenile-growth-test_9789264070202-en
- (32) Segner, H. (1998): Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. In: Braunbeck, T., Hinton, D. E. & Streit, B. (Hrsg): *Fish Ecotoxicology*.
- (33) Segner, H. (1998): Fish cell lines as tool in aquatic toxicology. In: Braunbeck, T., Hinton, D. E. & Streit, B. (eds.): *Fish Ecotoxicology*. Birkhauser Verlag Basel/Switzerland.
- (34) <http://www.aquatox.uni-hd.de/testsysteme.htm>
- (35) Bols N.C., Barlian A., Chirintrejo M., Caldwell S.J., Goegan P., Lee L.E.J. (1994): Development of a cell-line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Gills. *Journal of Fish Diseases* 17: 601–611. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00258.x/abstract>
- (36) <https://mlr.baden-wuerttemberg.de/de/unsere-service/presse-und-oeffentlichkeitsarbeit/pressemitteilung/pid/gruen-rot-foerdert-vier-projekte-zur-erforschung-von-ersatz-und-ergaenzungsmethoden-zum-tierversuch/>
- (37) European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection (2015): EURL ECVAM Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches (2015). <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-status-reports/eurl-ecvam-status-report-2015>
- (38) Kawano, A, Haiduk, C, Schirmer, K. et al. (2011): Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide. *Aquaculture Nutrition* 17: e241-e252. doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00757.x
- (39) Lee, L. E. J., Clemons, J. H., Bechtel, D. G. et al. (1993): Development and Characterization of a Rainbow Trout Liver Cell Line Expressing Cytochrome 450-dependent Monooxygenase Activity. *Cell Biology and Toxicology* 9/3: 279-294.
- (40) Kosmehl, T., Krebs, F., Manz, W. et al. (2004): Comparative Genotoxicity Testing of Rhine River Sediment Extracts Using the Comet Assay with Permanent Fish Cell Lines (RTG-2 and RTL-W1) and the Ames Test. *Genotoxicity of Rhine River Sediments. Journal of Soils & Sediments* 4/2: 84-94.
- (41) <https://www.nc3rs.org.uk/figcs-vitro-model-replace-ecotoxicity-testing-fish-pharmaceuticals>
- (42) Minghetti, M, Schnell, S, Chadwick, M. A., et al. (2014): A primary Fish Gill Cell System (FIGCS) for environmental monitoring of river waters. *Aquatic Toxicology* 154: 184–192.
- (43) Schnell, S, Lucy C Stott, L. C., Hogstrand, C. et al. (2016): Procedures for the reconstruction, primary culture and experimental use of rainbow trout gill epithelia. *Nature Protocols* 11/3: 490-498.
- (44) Fletcher, M., Kelly, S. P., PÄRT, P. et al. (2000): Transport Properties of Cultured Branchial Epithelia From Freshwater Rainbow Trout: A Novel Preparation with Mitochondria-Rich Cells. *The Journal of Experimental Biology* 203: 1523–1537. <http://jeb.biologists.org/content/jebio/203/10/1523.full.pdf>
- (45) Schnell, S., Bawa-Allah, K., Otitoloju, A. et al. (2015): Environmental monitoring of urban streams using a primary fish gill cell culture system (FIGCS). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120: 279–285.
- (46) Huuskonen, S. E., Hahn, M. E. & Lindström-Seppä, P. (1998): A Fish Hepatoma Cell Line (PLHC-1) as a Tool to Study Cytotoxicity and Cyp1A Induktion Properties of Cellulose and Wood Chip Extracts. *Chemosphere* 36/14: 2931-2932.
- (47) Adachi, K., Sumiyoshi, K., Ariyasu, R. et al. (2010): Susceptibilities of medaka (*Oryzias latipes*) cell lines to a betanodavirus. *Adachi et al. Virology Journal* 7: 150. <http://www.virologyj.com/content/7/1/150>
- (48) Saito, H., Sudo, M., Shigeoka, T. & Yamauchi, F. (1991): In vitro cytotoxicity of chlorophenols to goldfish GF-scale (GFS) cells and quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10/2: 235-241. DOI: 10.1002/etc.5620100212
- (49) <https://www.uni-tuebingen.de/forschung/informationen-zu-tierversuchen/fragen-und-antworten-zu-tierversuchen.html>
- (50) <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm#.VsYNCsXaRak.linkedin>
- (51) https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/background/TTC
- (52) Halder, M., Kienzler, A., Whelan, M. & Worth, A. (2014): EURL ECVAM Strategy to replace, reduce and refine the use of fish in aquatic toxicity and bioaccumulation testing. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Ispra.
- (53) Ellison, C. M., Piechota, P., Madden, J. C. et al. (2016): Adverse Outcome Pathway (AOP) informed modelling of aquatic toxicology - QSARs, read-across and inter-species verification of modes of action. *Environ. Sci. Technol.* DOI: 10.1021/acs.est.5b05918
- (54) <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Draft-Update-TG-203-for-commenting.pdf>
- (55) <http://www.eawag.ch/de/abteilung/utox/projekte/alternatives-to-animal-testing/>
- (56) Li, Y., Yang, F., Chen, Z. et al. (2014): Zebrafish on a Chip: A Novel Platform for Real-Time Monitoring of Drug-Induced Developmental Toxicity. *PLOS ONE* 9/4, e94792
- (57) <http://www.versuchstier-des-jahres.de/2003/>
- (58) <https://www.beuth.de/de/norm/din-en-iso-15088/113162875>
- (59) Benam, K. H., Dauth, S., Hassell, B. et al. (2015): Engineered In Vitro Disease Models. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 10: 195–262.

Zusätzlich empfehlenswert:

- (60) Braithwaite, V. (2010): Do fish feel pain? Oxford University Press, New York.
- (61) <http://www.drze.de/im-blickpunkt/tierversuche-in-der-forschung/module/leidfaehigkeit>
- (62) Cooke, S.J., Schreer, J. F., Wahl, D. H. & Philipp, D. P. (2002): Physiological impacts of catch-and-release angling practices on largemouth bass and smallmouth bass. Black Bass 2000: ecology, conservation and management. American Fisheries Society Symposium 31: 489- 512. <http://www3.carleton.ca/fecpl/pdfs/C%20and%20R%20LMB%20SMB%20MS.pdf>
- (63) Fischer, H. (Hrsg. 1971): Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band XXVI: Vergleichende Pharmakologie von Überträgersubstanzen in tiersystematischer Darstellung. Seite 473. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York.
- (64) <http://www.news-medical.net/health/What-is-Nociceptive-Pain.aspx>
- (65) Segner, H. (2012): Fish Nociception and pain - A biological perspective. Federal Committee on Non-Human Biotechnology ECNH, Bern. www.bundespublikationen.admin.ch, no 810.010.en http://www.ekah.admin.ch/fileadmin/ekah-dateien/dokumentation/publikationen/EKAH_Band_9_Fish__Englisch__V2_GzA.pdf
- (66) Lenzen, S. (2008): The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia 51: 216–226. DOI 10.1007/s00125-007-0886-7
- (67) Bury, N. R., Schnell, S. & Hogstrand, C. (2014): Gill cell culture systems as models for aquatic environmental monitoring. Review, The Journal of Experimental Biology 639-650. doi:10.1242/jeb.095430
- (68) Post, J. R., Sullivan, M., Cox, S. et al. (2002): Canada's Recreational Fisheries: The Invisible Collapse? Fisheries Management 27/1: 6-27. <http://faculty.forestry.ubc.ca/hinch/486/2015/Post%20et%20al.%202002%20Fisheries.pdf>
- (69) Tanneberger, K., Knöbel, M., Busser, F. J. M. et al. (2013): Predicting Fish Acute Toxicity Using a Fish Gill Cell Line-Based Toxicity Assay. Environ. Sci. Technol. 47: 1110–1119. dx.doi.org/10.1021/es303505z.
- (70) Schirmer, K., Knoebel, M. & Tanneberger, K. (2013): Gill cells – an alternative to whole fish for toxicity tests. EAWAG news 2/2013.
- (71) Schirmer, K. (o. J.): Towards alternatives to animal testing in ecotoxicological risk assessment. EAWAG, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology.

BLEIBEN SIE INFORMIERT

Abonnieren Sie unter: www.newsletter.tierrechte.de unseren Tierrechte-Newsletter und folgen Sie uns auf Facebook: www.facebook.com/menschenfuertierrechte

SPENDEN

Der Bundesverband ist seit über 30 Jahren als gemeinnützig und besonders förderungswürdig anerkannt. Spenden und Mitgliedsbeiträge sind steuerlich absetzbar.

Sparkasse Aachen
IBAN DE02 3905 0000 0016 0079 73
SWIFT-BIC AACSD33

KONTAKT

Geschäftsstelle:
Roermonder Straße 4a, 52072 Aachen
Tel. 0241 - 15 72 14 | Fax 0241 - 15 56 42
info@tierrechte.de | www.tierrechte.de

 **Menschen für Tierrechte**
Bundesverband der Tierversuchsgegner e. V.