

Literaturliste zum Artikel

Der „Fischartest“ - Untersuchungen zur Wirkung von Chemikalien auf Embryonen des Zebrafischblings

J. Fürkötter, R. Dahmen, H. Zielke, H. Hollert, J. Bohrmann

- [1] <http://data.un.org/Data.aspx?q=world+population&d=PopDiv&f=variableID:12;crID:900> (zuletzt aufgerufen am 27.07.2012)
- [2] Sander, K., Baumann, M. (1983): Das Experiment – Auslösung von embryonalen Fehlbildungen beim Zebrafischbling. *Biologie in unserer Zeit* 3:87-94
- [3] <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Aktuelles/menschen.did=86756.html> (zuletzt aufgerufen am 27.07.2012)
- [4] DIN EN ISO 15088 (2008): Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*). Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, 16 S.
- [5] Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N. (2005): Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. *Altex* 22:87-102
- [6] Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T. (2012): Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments - A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology* 33:128-132
- [7] <http://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html> (zuletzt aufgerufen am 07.08.2012)
- [8] Fürkötter, J. (2010) Umwelttoxikologie im Unterricht: Entwicklung eines Schulexperiments zur Wirkung von Umweltchemikalien auf Fischeier des Zebrafischblings (*Danio rerio*). Staatsexamensarbeit, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, RWTH Aachen
- [9] ISO 7346/3 (1996): Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 3: Flow-through method. International Organization for Standardization, Genf
- [10] David, A., Pancharatna, K. (2009): Developmental anomalies induced by non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 27:390-395
- [11] Cha, Y. I., Kim, S. H., Solnica-Krezel, L., Dubois, R. N. (2005): Cyclooxygenase-1 signaling is required for vascular tube formation during development. *Developmental Biology* 282:274-283
- [12] Cha, Y. I., Solnica-Krezel, L., Dubois, R. N. (2006): Fishing for prostanooids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Developmental Biology* 289:263-272
- [13] Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun J., Choi, K., Khim, J. S., Zhang, X., Gisey, J. P. (2010): Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Toxicology* 98:256-264
- [14] <http://www.klaerwerk.info/Abwasserreinigung/Informationen-zu-Endokrinen-Stoffen-und-Arzneimittel-im-Abwasser> (zuletzt aufgerufen am 27.07.2012)
- [15] <http://www.innovations-report.de/html/berichte/studien/bericht-7980.html> (zuletzt aufgerufen am 27.07.2012)
- [16] Fent, K. (2007): Ökotoxikologie: Umweltchemie – Toxikologie – Ökologie. Georg Thieme Verlag: Stuttgart/New York, 3:1-24

- [17] Hallare, A., Nagel, K., Köhler, H. R., Tribskorn, R. (2006): Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63:378-388
- [18] Sylvain, N. J., Brewster, D. R., Ali, D. W. (2010): Zebrafish embryos exposed to alcohol undergo abnormal development of motor neurons and muscle fibers. *Neurotoxicology and Teratology* 32:472-480
- [19] Philipp, E., Starke, A., Verbeek, R., Wellinghorst, R. (2008, Hrsg): *Biologie Grüne Reihe Materialien S II – Ökologie*. Bildungshaus Schulbuchverlage Westermann Schroedel, Diesterweg Schöningh Winklers GmbH, Braunschweig: 116 ff.
- [20] <http://wissen.spiegel.de/wissen/image/show.html?did=62492107&aref=image039/2008/12/06/ROSP200805001600164.PDF&thumb=false> (zuletzt aufgerufen am 07.08.2012)

Weitere Literatur auf Materialien und Arbeitsblättern:

- [21] Bundesministerium der Justiz (2010, Hrsg.): Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland (GG), auf: www.gesetze-im-internet.de (zuletzt aufgerufen 07.08.2012)
- [22] Europäische Union (1986, Hrsg.): Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Community* 358:1-28
- [23] Deutscher Bundestag (2003, Hrsg.): Tierschutzbericht 2003 - Unterrichtung der Bundesregierung, Drucksache 15//23 vom 26.03.2003, Berlin
- [24] Deutscher Bundestag (2005, Hrsg.): Tierschutzbericht 2005 – Unterrichtung durch die Bundesregierung, Drucksache 15/5405 vom 27.04.2005, Berlin
- [25] Deutscher Bundestag (2007a, Hrsg.): Tierschutzbericht 2007 - Unterrichtung durch die Bundesregierung, Drucksache 16/5044 vom 19.04.2007, Berlin
- [26] DIN 38412-31 (1989): Deutsches Verfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L): Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Fischen über Verdünnungsstufen (L 31). Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, 8 S.
- [27] Deutscher Bundestag (2007b, Hrsg.): Beschlussempfehlung des Petitionsausschusses (2. Ausschuss). Drucksache 16/4172 vom 31.01.2007, Berlin
- [28] Europäische Gemeinschaft (2006, Hrsg.): Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. *Official Journal of the European Union*, 396:1-849

Materialien und Arbeitsblätter zum Artikel

Der „Fischartest“ - Untersuchungen zur Wirkung von Chemikalien auf Embryonen des Zebraäbblings

J. Fürkötter, R. Dahmen, H. Zielke, H. Hollert, J. Bohrmann

Material 1: Das Tierschutzgesetz [7]

Am 24. Juli 1972 wurde in der Bundesrepublik Deutschland das geltende Tierschutzgesetz (TierSchG) verabschiedet, welches in den vergangenen Jahrzehnten mit Ergänzungen und Veränderungen versehen worden ist.

§ 1

Zweck dieses Gesetzes ist es, aus der Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen. Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen.

§ 7

(1) Tierversuche im Sinne dieses Gesetzes sind Eingriffe oder Behandlungen zu Versuchszwecken

1. an Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für diese Tiere oder
2. am Erbgut von Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für die erbgutveränderten Tiere oder deren Trägartiere verbunden sein können.

(2) Tierversuche dürfen nur durchgeführt werden, soweit sie zu einem der folgenden Zwecke unerlässlich sind:

1. Vorbeugen, Erkennen oder Behandeln von Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder körperlichen Beschwerden oder Erkennen oder Beeinflussen physiologischer Zustände oder Funktionen bei Mensch oder Tier,
2. Erkennen von Umweltgefährdungen,
3. Prüfung von Stoffen oder Produkten auf ihre Unbedenklichkeit für die Gesundheit von Mensch oder Tier oder auf ihre Wirksamkeit gegen tierische Schädlinge,
4. Grundlagenforschung.

Bei der Entscheidung, ob Tierversuche unerlässlich sind, ist insbesondere der jeweilige Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse zugrunde zu legen und zu prüfen, ob der verfolgte Zweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren erreicht werden kann.

(3) Versuche an Wirbeltieren dürfen nur durchgeführt werden, wenn die zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden der Versuchstiere im Hinblick auf den Versuchszweck ethisch vertretbar sind. Versuche an Wirbeltieren, die zu länger anhaltenden oder sich wiederholenden erheblichen Schmerzen oder Leiden führen, dürfen nur durchgeführt werden, wenn die angestrebten Ergebnisse vermuten lassen, dass sie für wesentliche Bedürfnisse von Mensch oder Tier einschließlich der Lösung wissenschaftlicher Probleme von hervor-ragender Bedeutung sein werden.

(4) Tierversuche zur Entwicklung oder Erprobung von Waffen, Munition und dazugehörigem Gerät sind verboten.

(5) Tierversuche zur Entwicklung von Tabakerzeugnissen, Waschmitteln und Kosmetika sind grundsätzlich verboten. Das Bundesministerium wird ermächtigt, durch Rechtsverordnung mit Zustimmung des Bundesrates Ausnahmen zu bestimmen, soweit es erforderlich ist, um

1. konkrete Gesundheitsgefährdungen abzuwehren, und die notwendigen neuen Erkenntnisse nicht auf andere Weise erlangt werden können, oder
2. Rechtsakte der Europäischen Gemeinschaft oder der Europäischen Union durchzuführen.

§ 8

(1) Wer Versuche an Wirbeltieren durchführen will, bedarf der Genehmigung des Versuchsvorhabens durch die zuständige Behörde.

(...)

(3) Die Genehmigung darf nur erteilt werden, wenn

1. wissenschaftlich begründet dargelegt ist, dass
 - a) die Voraussetzungen des § 7 Abs. 2 und 3 vorliegen,
 - b) das angestrebte Versuchsergebnis trotz Ausschöpfung der zugänglichen Informationsmöglichkeiten nicht hinreichend bekannt ist oder die Überprüfung eines hinreichend bekannten Ergebnisses durch einen Doppel- oder Wiederholungsversuch unerlässlich ist;
2. der verantwortliche Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter die erforderliche fachliche Eignung insbesondere hinsichtlich der Überwachung der Tierversuche haben und keine Tatsachen vorliegen, aus denen sich Bedenken gegen ihre Zuverlässigkeit ergeben;
3. die erforderlichen Anlagen, Geräte und anderen sachlichen Mittel vorhanden sowie die personellen und organisatorischen Voraussetzungen für die Durchführung der Tierversuche einschließlich der Tätigkeit des Tierschutzbeauftragten gegeben sind;
4. eine den Anforderungen des § 2 entsprechende Unterbringung und Pflege einschließlich der Betreuung der Tiere sowie ihre medizinische Versorgung sichergestellt ist (...)

Zudem ist der Schutz der Tiere als Staatsziel mit dem Blick auf zukünftige Generationen in § 20a des **Grundgesetzes der Bundesrepublik Deutschland** [21] festgelegt.

Beim **Fischeitest** (bis 48 h Expositionsdauer, [4]) handelt es sich nicht um einen Tierversuch gemäß § 7 TierSchG. Die Versuchsorganismen werden nach der Tierschutzrichtlinie 86/609/EEC [22] nicht als Tiere eingestuft, da es sich noch um Embryonen handelt. Ab wann sich entwickelnde Fische „Tiere“ sind, ist nicht genau festgelegt. Dies hat unterschiedliche Einstufungen in den einzelnen Bundesländern zur Folge. So wird der Fischeitest in Nordrhein-Westfalen mit Beginn der Schlüpfphase (ca. 48 h nach Eiablage) als Tierversuch gewertet. In Baden-Württemberg gelten sich entwickelnde Fische erst dann als Tiere, wenn der Dotter aufgezehrt ist und die selbstständige Nahrungsaufnahme beginnt (ab 72 h).

Material 2: Fische als Versuchstiere

Der Tierschutzbericht 2007 zeigt auf, dass in den Jahren 2001 bis 2004 in Deutschland jährlich durchschnittlich 203.000 adulte Fische zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet wurden. Das Maximum wurde im Jahr 2001 mit 303.590 Fischen erreicht. Für toxikologische Untersuchungen wurden in diesen Jahren durchschnittlich 61.300 Fische verwendet (Deutscher Bundestag [23, 24, 25]). Die meisten dieser Tierversuche waren akute Fischtests mit der Goldorfe (*Leuciscus idus melanotus*) nach DIN 38412-31 [26]. Die Bestimmung des LC₅₀-Werts im Rahmen dieses Testverfahrens geht mit dem Sterben der adulten Versuchstiere einher, welches mit Schmerzen, Leiden und Schäden verbunden ist.

Zweifel am Nutzen eines solchen Wertes, der die akute Toxizität einer Probe nach kurzer Expositionsdauer als Endpunkt des Tests festlegt, wurden bereits in den 1990er Jahren formuliert. Demnach sollte eher die chronische Toxizität von Proben als Endpunkt der Testverfahren bestimmt werden, da diese für ökotoxikologische Untersuchungen eine höhere Relevanz aufweist. Sowohl Zytotoxizitätstests mit verschiedenen Zellkulturen, z. B. der Neutralrot-Retentionstest, als auch der Fischeitest wurden als Alternativen zum akuten Fischtest in Erwägung gezogen. Beide gelten nach §7 TierSchG (s. Material 1) nicht als Tierversuche, da mit Zellen bzw. Fischembryonen gearbeitet wird.

Im Abschlussbericht des Petitionsausschusses aus dem Jahr 2007 [27] wird das zügige Abschaffen des Goldorfen-Fischtests im Abwasserabgabengesetz (AbwAG) gefordert. Nach einem Beschluss des Bundestages aus dem Jahr 2004, der zum 01. Januar 2005 in Kraft getreten ist, wurde die Abschaffung und das Ersetzen des akuten Fischtests mit der Goldorfe durch den Fischeitest mit dem Zebraabärbling [4] beschlossen. Die Zahlen aus dem Tierschutzbericht 2007 zu den für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Fischen zeigen auf, dass im Jahr 2005 nur noch 101.551 Fische insgesamt und davon 40.911 für toxikologische Untersuchungen verwendet wurden. Dies bedeutet eine Verringerung der Gesamtzahl um 50 % und der für toxikologische Untersuchungen verwendeten Fische um 30 %. Diese Reduktion kann auf den Beschluss des Bundestages 2004 zurückgeführt werden (Deutscher Bundestag [24, 25, 27]).

Im Kontext der Suche nach Alternativen zu Tierversuchen spielt auch das neue EU-Chemikalienrecht REACH eine entscheidende Rolle [28]. REACH steht für **R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and **R**estriction of **C**hemicals, also für die Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien. Diese Richtlinie hat in allen Mitgliedsstaaten die bestehenden Chemikalienverordnungen ersetzt. Ziel der Verordnung ist es, die gefährlichsten Stoffe schrittweise vom Markt zu entnehmen und durch andere, weniger gefährliche bzw. schädigende zu ersetzen.

Material 5: Beispiel für eine Testreihe mit Ethanol (Test 2)

Tab. 5: Subletale Parameter und Mortalität im Fischeitest mit Ethanol

Verdünnungsstufe (Konzentration [ml/L])	Embryonen (n = 10, je Konzentration)					Mortalität [%]
	1 6	2 7	3 8	4 9	5 10	
A (5)	N	BI*	N	SW,M,W	N	
	N	BI*	N	N	N	10
B (10)	N	H*,BI,Ut,M,W	K	SW,H*,BI	P,P*,Ut,M,W	
	H*,BI,P,P*	N	N	BI*	N	20
C (25)	Vf	K	H*,BI,P,P*, Ut,M,W	H*,BI,P,P*, Ut,M,W	K	
	Vf	H*,BI	K	SW,H,BI,P, P*,Ut,M,W	H*,BI	60
D (50)	K	K	K	K	K	
	K	K	K	K	K	100

Die Embryonen der Kontrolle zeigten fast ausschließlich Normalentwicklung (vgl. Abb. 5).

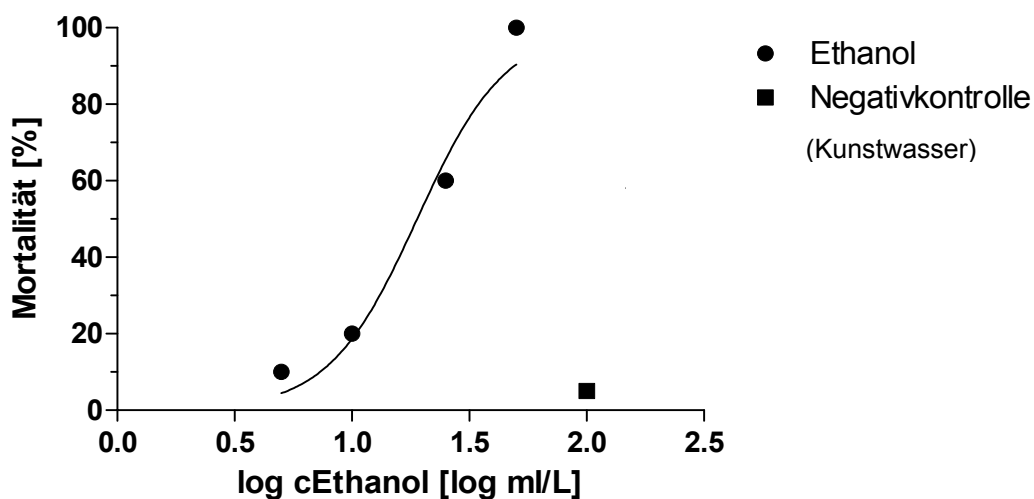


Abb. 5: Embryotoxizität verschiedener Ethanol-Konzentrationen (log cEthanol) im Vergleich zum Kontrollansatz nach 48 h Exposition bei Raumtemperatur (Mortalitätsrate in %).

Ermittelter LC_{50} -Wert: 19 ml/L, entsprechend einem Ethanolgehalt von 1,9 Vol.-%.

Arbeitsblatt 1: Hypothesenbildung und Planung von Experimenten

Infotext:

Experimente sind Fragen des Menschen an die Natur. Sie liefern Antworten und ermöglichen begründete Aussagen über Ursache-Wirkungs-Beziehungen. Zu diesem Zweck müssen Experimente gründlich geplant werden. Folgende Aspekte müssen bei der Planung berücksichtigt werden: Anzahl der Experimentalansätze, unterschiedliche Bedingungen der Experimentalansätze, Kontrollansätze.

Wissenschaftliches Vorgehen basiert auf einer Vielzahl von Einzelschritten, die in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt sind. Ausgangspunkt einer jeden Hypothesenbildung und Experimentplanung ist ein Problem oder eine Fragestellung. Basierend auf dieser Fragestellung wird eine erste Hypothese (Hypothese I) gebildet, die durch ein Experiment (Experiment I) geprüft und eventuell falsifiziert wird. Aufgrund des Ergebnisses wird die erste Hypothese verändert (Hypothese II) und diese durch ein weiteres Experiment (Experiment II) überprüft etc. Am Ende eines solchen Prozesses steht - mit etwas Glück - eine Theorie, die das Problem erklärt bzw. die Fragestellung auflöst. Bei diesem Vorgehen kann jedoch eine Hypothese weder gänzlich widerlegt noch gänzlich bestätigt werden.

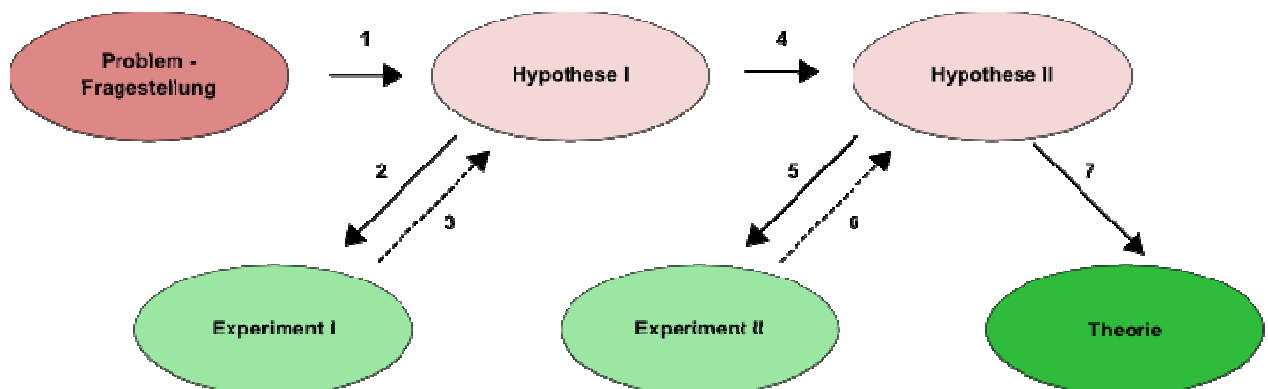


Abb. 1.1: Einzelschritte bei der Hypothesenbildung und Experimentplanung

Arbeitsaufträge:

1. Stelle (mindestens) eine Hypothese zu den Wirkungen von Ibuprofen bzw. Ethanol auf Fischembryonen auf.
2. Überlege dir, wie du deine Hypothese experimentell überprüfen kannst, und plane dazu ein Experiment.