

4. Sitzung der Bf3R-Kommission

Ergebnisprotokoll vom 5. September 2019

Die Bf3R-Kommission berät als ehrenamtliches und unabhängiges Sachverständigen-gremium das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in seinen wissenschaftlichen Aktivitäten in Fragen des Schutzes von Versuchstieren. Mit ihrer wissenschaftlichen Expertise berät die Kommission das BfR.

Die Kommission besteht aus 11 Mitgliedern, die für einen Turnus von vier Jahren über ein offenes Ausschreibungs- und Bewerbungsverfahren berufen wurden und sich durch wissenschaftliche Expertise auf ihrem jeweiligen Fachgebiet auszeichnen. Die Kommissionsmitglieder sind zur Verschwiegenheit gegenüber Dritten und zur unparteilichen Erfüllung ihrer Aufgabe verpflichtet.

Eventuelle Interessenkonflikte zu einzelnen in der Sitzung behandelten Tagesordnungspunkten (TOPs) werden transparent abgefragt und offengelegt. Aus dem vorliegenden Ergebnisprotokoll geht die wissenschaftliche Meinung der Bf3R-Kommission hervor. Die Empfehlungen der Kommission haben allein beratenden Charakter. Die Kommission selbst gibt keine Anordnungen und keine Gutachten heraus und ist dem Bf3R / BfR gegenüber auch nicht weisungsbefugt (und umgekehrt).

TOP 1 Begrüßung durch die Vorsitzende der Bf3R-Kommission und Vorstellung eines neuen Mitglieds der Bf3R-Kommission

Die Vorsitzende der Bf3R-Kommission, Frau Dr. Scheel, begrüßt die Sitzungsteilnehmerinnen und -teilnehmer. Der Leiter des Bf3R begrüßt die Kommissionsmitglieder und stellt ein aufgrund des Ausscheidens eines Teilnehmers das nachberufene Mitglied der Kommission vor. Es erfolgt eine kurze Vorstellungsrunde aller Teilnehmenden.

TOP 2 Annahme der Tagesordnung und Abfrage von Interessenkonflikten

Frau Dr. Scheel fragt nach Änderungswünschen zur Tagesordnung. Die Tagesordnung wird ohne Änderungen angenommen. Die Beschlussfähigkeit der Kommission wird festgestellt.

Die Vorsitzende Frau Dr. Scheel fragt sowohl mündlich als auch schriftlich, ob Interessenkonflikte zu einzelnen TOPs oder speziellen Themen bestehen. Die Mitglieder geben an, dass diesbezüglich keine Interessenkonflikte vorliegen.

TOP 3 Aktueller Themenüberblick

a. Aktuelles aus der Forschungsförderung

Ein Mitarbeiter des BfR stellt die aktuelle Ausschreibung der Bf3R-Forschungsförderung vor. Die Ausschreibung findet alle zwei Jahre statt und richtet sich vorrangig an Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler, die innovative Forschungsideen von hoher Qualität im Bereich der 3R (Replace/Vermeiden, Reduce/Verringern, Refine/Verbessern) haben und experimentelle Daten für eine erfolgreiche Bewerbung bei größeren Förderprogrammen generieren möchten. Die aktuelle Ausschreibung endete im Mai 2019. Es wird der Ablauf des Bewerbungsverfahrens vorgestellt. Darüber hinaus werden Einblicke gegeben, wie für die Ausschreibung

geworben wurde und wie die eingegangenen Anträge auf einzelne Bundesländer nach der Art der Forschungseinrichtungen und dem Geschlecht der Antragstellenden verteilt sind. Für diese Bewerbungsperiode werden voraussichtlich im Oktober 2019 Mitteilungen über die Entscheidung verschickt, die Förderung beginnt ab Anfang 2020. Um auf die Fördermöglichkeiten im Bereich der 3R aufmerksam zu machen, veranstaltet das BfR am 20. September 2019 ein Symposium zur 3R-Forschungsförderung. Im Rahmen dieser Veranstaltung ist eine Parallelsession geplant, in der ein Erfahrungsaustausch der Förderinstitutionen über die Sichtbarkeit, Organisation und Qualitätssicherung der Förderung im 3R-Bereich diskutiert werden soll.

Beratungsergebnis der Kommission: Die Kommission erklärt die Wichtigkeit der Forschungsförderung als Anschubfinanzierung, um eine weitere Verbreitung der 3R-Prinzipien zu unterstützen. Als weitere Maßnahme schlägt die Vorsitzende der Kommission vor, die Präregistrierung verstärkt als Inhalt der Lehre auf dem Gebiet der Versuchstierkunde einzubauen. Es wird jedoch von der Kommission betont, dass die Möglichkeit einer anonymen Veröffentlichung der Tierversuchsvorhaben die Zahl der Präregistrierungen steigern könnte.

b. Neue Impulse für die Nichttechnischen Projektzusammenfassungen (NTPs)

Ein Mitarbeiter des BfR gibt Einblicke in das Medienprojekt zur Verbesserung der allgemeinen Verständlichkeit der NTPs. An einem Beispiel wird sichtbar gemacht, dass die NTPs oft ihr Ziel verfehlen und somit nicht für fachfremdes Publikum geeignet sind. Die Digitale Schulungsplattform für Methodische Ansätze zur Reduktion von Tierversuchen (3R-SMART) wird vorgestellt. Mit Hilfe von animierten Erklärvideos werden die Kriterien einer allgemein verständlichen NTP demonstriert. Der Seriencharakter der Erklärvideos wurde gewählt, um den Erwartungen der Zielgruppe zu entsprechen. Dabei werden animierte Figuren eingesetzt, denn Serien mit Schauspielern wie z. B. „Emergency Room“ oder „Grey’s Anatomy“ haben nur wenig Akzeptanz bei relevanten Berufsgruppen. Die drei Protagonisten (Marmosette, Ratte und Oktopus) wurden aufgrund ihrer Relevanz in den Tierversuchen ausgewählt. Insbesondere fallen die Tierversuche an Kopffüßern erst seit 2013 unter die Genehmigungspflicht, was noch weitestgehend unbekannt ist. Pro Episode sollen in 1-3 Minuten definierte Lerninhalte vermittelt werden. Insgesamt sind sechs Episoden geplant.

Beratungsergebnis der Kommission: Die Kommission betont die Bedeutung der Kommunikation zu NTPs und begrüßt die neuen Maßnahmen. Die Vorsitzende der Kommission erkundigt sich, ob auch Best-Practice-Beispiele eingesetzt werden. Ein Mitarbeiter des BfR erklärt, dass die Serie sich auf wenige konkrete Satzbeispiele aus NTPs konzentriert. Zusätzlich weisen die Folgen die Antragstellenden auf weitere Hilfsmittel wie Vorlagen für die NTPs sowie Glossare zur Erklärung der Fachbegriffe hin. Die Kommission begrüßt die Wahl des Formats der Kommunikation und erklärt die Videos als sehr wichtig. Dadurch werden die jungen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler angesprochen und die allgemeine Akzeptanz der Tierversuche verbessert. Der Einsatz von bildlicher Sprache und die allgemein verständlichen Botschaften werden von der Kommission besonders hervorgehoben. Eine Mitarbeiterin des BfR merkt an, dass die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler in der Verantwortung stehen, sich bei der Beschreibung der Versuche klar und verständlich auszudrücken, auch damit die Belastung der Tiere nicht widersprüchlich dargestellt wird. Das BfR

möchte hier die Forscherinnen und Forscher im Rahmen des 3R-SMART-Projekts unterstützen. Ein Kommissionsmitglied fragt nach der Auswahl der Sprache und Sprecher. Ein Mitglied des BfR erklärt, dass keine Stereotypen bedient werden sollen und somit z. B. keine Dialekte eingebaut werden. Geplant ist auch eine Übersetzung in die englische Sprache, um auch den internationalen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern den Zugang zu Lernvideos zu ermöglichen. Eine Mitarbeiterin des BfR ergänzt, dass von Seiten der EU ein Interesse zur Verbesserung der Qualität der NTPs besteht. Die Kommission stellt ihre Funktion als Multiplikatorin heraus und erkundigt sich nach der späteren Zugänglichkeit der Videos. Die Mitarbeiter des BfR antworten, dass eine Lernplattform durch die Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie) in Kooperation mit der Philipps-Universität Marburg (Institut für Tierphysiologie) zur Verfügung gestellt wird. Die Möglichkeit der Veröffentlichung der Lernvideos auf YouTube wird auch geprüft. Die Kommission spricht eine Empfehlung aus, für die erklärende Videoreihe bei kommenden Konferenzen und Tagungen zu werben: Die Figuren können z.B. als Schlüsselanhänger gedruckt werden.

c. Aktuelle Entwicklungen im Bereich der Validierung

Die Kommissionsvorsitzende erkundigt sich nach der Vorstellung der internationalen Aktivitäten im Bereich des Versuchstierschutzes und der Rolle des „European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)“, die als Themen in der 3. Sitzung der Bf3R-Kommission vorgeschlagen worden waren. Ein Mitarbeiter des BfR antwortet, dass ECVAM sich gerade in der Evaluation der letzten Förderperiode befindet und sich aus diesem Grund bei der Validierung von Alternativmethoden momentan zurückhält, auch wenn ECVAM nach wie vor eine signifikante Anzahl an Projekten unterstützt. Ein Mitarbeiter des BfR weist darauf hin, dass zusätzlich zum Output über die Eignung einer Methode die nachhaltige Verfügbarkeit und Transparenz der gesammelten Daten gewährleistet sein muss. Der Leiter des Bf3R macht darauf aufmerksam, dass auch das BfR wegen der hohen Anzahl an Daten sein Forschungsdatenmanagementsystem künftig ausbauen wird.

Ein Mitarbeiter des BfR stellt den Bf3R-Kompetenzbereich 3 „Alternativmethoden in der Toxikologie“ und das OECD-Prüfrichtlinienprogramm vor. Die Problematik der gegenseitigen Anerkennung von Daten (Mutual Acceptance of Data) im Rahmen der Entwicklung von Prüfrichtlinien durch die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) wird angesprochen. Daten, die gemäß den Prüfrichtlinien ermittelt werden, wenn diese unter Good Laboratory Practice (GLP)-Bedingungen entstanden sind, müssen in allen Mitgliedsstaaten akzeptiert werden. Dies gilt zum Beispiel für die Industriechemikalien, die in Europa durch die EU-Chemikalienverordnung REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) reguliert werden. Von 66 Projekten des OECD-Prüfrichtlinienprogramms gibt es nur wenige Alternativen zu Tierversuchen. Als eine mögliche Ursache wird der aktuell komplexe und aufwendige Validierungsprozess genannt, in dem unter anderem die Aussagekraft der Methode im Vergleich zu Studien an Versuchstieren bewertet wird. So wird oft die Anzahl der falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse in Relation zu Tierversuchsdaten kalkuliert. Diese Kalkulation ist jedoch mit einer gewissen Unsicherheit verbunden. Stattdessen sollen z. B.

die biologische Relevanz und die Integration einer Testmethode in die Teststrategien zum Fokus der Bewertung werden. Ein Mitarbeiter des BfR stellt zwei Workshops und zwei Publikationen des BfR zusammen mit weiteren Institutionen vor, die sich 2017 und 2018 dieser Problematik gewidmet haben.

Bei Patent- und Intellectual Property Rights-geschützten Methoden ist besonders auf die Lizenzverfügbarkeit, -vergabe und -kosten nach dem FRAND-Prinzip (fair, reasonable and non-discriminatory) zu achten. Dies ist seit diesem Jahr auch verpflichtend im OECD-Leitfaden 298 festgelegt. Zusätzlich muss vor dem möglichen Umstieg auf *In-silico*-Methoden deren GLP-Konformität, Zugänglichkeit und Nachvollziehbarkeit bei Entscheidungsprozessen berücksichtigt werden. Ein Mitarbeiter des BfR weist anschließend auf die Internetseite des Adverse Outcome Pathway Wiki als weiterführende Informationsquelle hin.¹ Hier werden die aktuell verfügbaren biologischen Vorgänge und adversen Effekte der Chemikalien zusammengefasst.

Beratungsergebnis der Kommission: Die Kommission unterstreicht die große Bedeutung der Validierung und Etablierung von Alternativmethoden, um die Anzahl der Tierversuche zu reduzieren, wobei die aktuellen Problematiken zur Kenntnis genommen werden. Die Zuverlässigkeit der Daten zur Sicherheitsprüfung von Chemikalien wird hinterfragt. Ein Mitarbeiter des BfR merkt an, dass die Vorhersagekraft der Prüfmethode vor allem die biologische und physiologische Relevanz in den Vordergrund stellen soll. Zum Beispiel sollen Chemikalien im Vergleich zur früheren Praxis der hohen Dosierung mit physiologisch relevanten Dosen getestet werden. Des Weiteren ist der Zugang zum Referenzmaterial oft ein Problem sowie die Patentierung von neuen Prüfmethode und die damit verbundenen Lizenzkosten und -verfügbarkeiten.

*Die Vorsitzende der Kommission merkt an, dass die Daten aus OECD-Prüfrichtlinien außerhalb der OECD-Mitgliedsstaaten (z. B. China) nicht immer anerkannt werden. Ein Mitarbeiter des BfR stimmt dieser Problematik zu und weist darauf hin, dass es besonders kritisch sei, auch außerhalb der OECD-Länder die Sicherheitsprüfungen von Chemikalien zu harmonisieren. Ein Kommissionsmitglied betont den besonders hohen Stellenwert der Weiterentwicklung von *In-silico*-Prüfmethode aufgrund ihres Potentials für die Reduktion von Tierversuchen. Allerdings werden die Chemikalien hier nach Strukturmerkmalen systematisch ausgewertet, ohne dass man die Mechanismen dahinter versteht. Ein Mitglied der Kommission merkt an, dass insbesondere die Nachvollziehbarkeit und Transparenz von Bewertungen einer Optimierung bedürfen, und erkundigt sich, auf welche Daten die Software-Algorithmen bei *In-silico*-Prüfmethode referenzieren. Ein Mitarbeiter des BfR antwortet, dass die Algorithmen meist anhand einer kleinen Menge an chemischen Substanzen trainiert werden, da die Daten zum Training von *In-silico*-Prüfmethode nur begrenzt zur Verfügung stehen. Ein Kommissionsmitglied merkt an, dass zudem oft keine Möglichkeit besteht, die schon generierten Daten zu verbessern.*

Ein Kommissionsmitglied fragt, ob Gemische mit gleicher Methodik wie Einzelsubstanzen bewertet werden können. Ein BfR-Mitarbeiter antwortet, dass Gemische aufgrund vieler toxi-kinetischer Aspekte und potentiell (mehr als) additiver Wirkung anders bewertet werden müssen. Das BfR hat die limitierte Aussagekraft von Rechenmodellen kürzlich publiziert.²

¹ <https://aopwiki.org/>

² Kurth, D., et al., A comparative assessment of the CLP calculation method and in vivo testing for the classification of plant protection products. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2019. **101**: p. 79-90

Eine Validierung von In-vitro-Methoden für Gemische ist aber schwer vorstellbar, da es hier unter anderem keine Referenzmixturen gibt und diese auch kaum definiert werden können. Falls es Hinweise auf den Wirkmechanismus von Einzelsubstanzen gibt, könnten In-vitro-Testmethoden allerdings helfen.

Die Meldung, dass die Niederlande als erster EU-Mitgliedsstaat einen Plan zum Ausstieg aus Tierversuchen bis 2025 präsentierten, wird diskutiert. Damit die Tierversuche auch in der Grundlagenforschung und in der angewandten und translationalen Forschung beendet werden können, muss die Entwicklung und Validierung von Alternativmethoden beschleunigt werden.

TOP 4 In-vitro-Testmethoden

a. Übersicht über die aktuell verfügbaren Methoden und Entwicklung eines neuen Testmodells zum Nachweis endokrin-disruptiver Wirkung

Ein Mitarbeiter des BfR stellt ein aktuelles Forschungsprojekt im BfR vor, in dem ein *In-vitro*-Screening Testsystem für endokrin-disruptive Substanzen entwickelt wird. Die Verteilung des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin und die Morphologie der Zellmembran werden dabei zur Vorhersage östrogenen und antiöstrogenen Aktivität von Testsubstanzen genutzt. Diese biologischen Marker haben eine klinische Relevanz, denn der Verlust von E-Cadherinverbindungen zwischen den Brustkrebszellen kann zur Migration der Zellen und somit Metastasierung des Brustkrebs führen. Der entwickelte *In-vitro*-Assay wurde mit 17 Referenzchemikalien validiert und kann chemische Substanzen mit sowohl östrogenen als auch antiöstrogenen Wirkung in einem bildgebenden Verfahren detektieren, wobei die Prädiktivität der Kombination verschiedener *In-vitro*-Testsysteme entspricht. Im nächsten Schritt wird das BfR an der Automatisierung des Assays arbeiten.

Beratungsergebnis der Kommission: Die Kommission begrüßt die klinische Relevanz des am BfR entwickelten Assays und merkt an, dass diese Methode eine Verbesserung zu den aktuell eingesetzten diagnostischen Tests darstellen kann. Die Kommission erkundigt sich nach dem Mechanismus der Rezeptorbindung der Substanzen und der Homogenität der Färbungen im entwickelten Assay. Ein Mitarbeiter des BfR erklärt den Verdrängungsmechanismus bei der Bindung an den Rezeptor und das Prinzip der bildlichen Erfassung der Daten. Ein Mitglied der Kommission fragt nach dem Einsatzbereich der patentierten Methode. Ein Mitarbeiter des BfR erklärt, dass die Methode in erster Linie zum Screening von östrogenen und antiöstrogenen Wirkung in chemischen Substanzen verwendet wird, z. B. zur Überprüfung von Pharmazeutika, bevor sie als Therapie eingesetzt werden können. Wegen der klinischen Relevanz ist es zudem vorstellbar, dass der Assay zur Identifizierung von metastasierendem Brustkrebs verwendet werden kann. Das Ziel der Patentierung der Methode ist die Sichtbarkeit und Anerkennung in den Fachbereichen. Die Vorsitzende der Kommission sieht die Aufklärung des Mechanismus als sehr wichtig an, denn ein besseres Verständnis der biologischen Prozesse liefere eine bessere Vorhersage, ab welcher Konzentration eine chemische Substanz mit östrogenen Wirkung toxisch wirkt. Der Leiter des BfR antwortet, dass momentan vorhersagbar sei, bei welcher Konzentration die morphologischen Veränderungen in der Membran der Zellen hervorgerufen bzw. verhindert werden können. Diese Veränderung der Zellmembran wurde mechanistisch detailliert untersucht und die Erkenntnisse darüber liegen vor, allerdings ist die Kausalität zwischen der östrogenen Wirkung einer Substanz und der Metastasierung der Krebszellen noch unbekannt und muss mit Hilfe von klinischen Studien

weiter untersucht werden. Es wird von Seiten der Kommission hervorgehoben, dass die zukünftige Verbesserung und Anpassung des Assays hin zu einer in der klinischen Diagnostik eingesetzten Methode aufgrund der limitierten Verfügung der Patientenproben eingeschränkt sein könnte.

b. Circadiane Regulationssysteme in alternativen Testmethoden

Ein Mitarbeiter des BfR stellt ein aktuelles Projekt am BfR vor, in dem die Abbildung von physiologischen Eigenschaften von Menschen und Tieren in alternativen Testmethoden erforscht wird. Bei den toxikologischen Testungen von Substanzen werden Zellkulturen eingesetzt, die den *In-vivo*-Zustand nur vereinfacht abbilden. So werden oft die zirkadianen Perioden nicht mituntersucht. Ein Mitarbeiter des BfR stellt Forschungsdaten vor, aus denen hervorgeht, dass die Synchronisierung oder Nichtsynchronisierung des zirkadianen Rhythmus in den verwendeten humanen Zellkulturen einen Einfluss auf die Antwort der Zellen auf die chemischen Substanzen nimmt und somit die Bewertung der Toxizität mitbeeinflusst. Die Wiederherstellung eines einheitlichen zirkadianen Rhythmus erhöht die physiologische Relevanz und Akzeptanz der *In-vitro*-Testsysteme in den regulatorischen Toxizitätsuntersuchungen. Ein Mitarbeiter des BfR weist anschließend darauf hin, dass man weitere Informationen über das Projekt in der Publikation des wissenschaftlichen Journals *Environment International* finden kann.³

*Beratungsergebnis der Kommission: Die Mitglieder der Kommission diskutieren über Vorteile und Limitierungen des Projekts. Es wird festgestellt, dass man Kontrollexperimente braucht, um eine Übersynchronisierung zu verhindern. So kann eine zu stabile zirkadiane Periode die Effekte der chemischen Substanzen auf die Zellen maskieren. Ein Mitglied der Kommission erkundigt sich, ob Substanzen getestet wurden, die den zirkadianen Rhythmus nachweislich beeinflussen. Ein Mitarbeiter des BfR erklärt, dass in der vorgestellten Forschungsarbeit beide Substanzgruppen untersucht wurden: die den zirkadianen Rhythmus einleiten und aufheben. Die Kommission empfiehlt zudem, dass man in den pharmakologischen *In-vivo*-Testungen die Protokolle hinsichtlich der Überwachung des zirkadianen Rhythmus optimieren soll, um eine bessere Korrelation mit den *In-vitro*-Daten zu erzielen. Es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, wie man die Synchronisierung der zirkadianen Periode in Zellkulturen einleiten kann. Die Kommission betont, dass man für jede neue Substanz auch die Wechselwirkung auf die Synchronisierung testen soll.*

TOP 5 Abschlussdiskussion

Beratungsergebnis der Kommission: Die Auswahl der Projekte und die Vorträge finden viel Interesse und die Kommission begrüßt das Engagement der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des BfR in den vorgestellten Bereichen. Der Leiter des Bf3R bedankt sich für das Feedback.

Für die nächsten Sitzungen werden folgende weitere Themen vorgeschlagen: Überblick über die Kommunikations- und Öffentlichkeitsarbeit des Bf3R, Berichte zum Fortschritt des 3R-SMART-Projekts, zum Workshop „Prüfung und Darlegung der ethischen Vertretbarkeit in

³ Ndikung., et al., *Restoring circadian synchrony in vitro facilitates physiological responses to environmental chemicals*. *Environment International*, 2020 **134**, 105265.

Tierversuchsanträgen“ und zum Symposium zur 3R-Forschungsförderung; weiterhin die Vorstellung des Projekts SMAFIRA (Suchmaschine für Alternativmethoden) und aquatische Organismen mit Refinement und Besichtigung der Halteanlage für Sepien als Schwerpunktthemen.

Die Vorsitzende Frau Dr. Scheel bedankt sich bei allen Mitgliedern für ihre Teilnahme und schließt die heutige Sitzung. Die nächste Sitzung der Kommission wird im Februar 2020 in Berlin stattfinden.