

Dr. Nataša Petrovič

Center za zdravstveno ekologijo
Nacionalni inštitut za javno zdravje
Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana, SLOVENIJA

# Nove metode testiranja razvojne imunotoksičnosti

# New methods for testing developmental immunotoxicity

8. KONGRES SLOVENSKEGA TOKSIKOLOŠKEGA DRUŠTVA (SLOTOX)

**22. OKTOBER 2026**

Hvala organizatorjem za povabilo!

- ✓ Razvojna imunotoksičnost
- ✓ Testiranje v regulatorne namene (kemijska varnost)
- ✓ Nove metode (NAMi)

Review > Adv Med. 2014:2014:867805. doi: 10.1155/2014/867805. Epub 2014 Jan 23.

# Developmental Immunotoxicity, Perinatal Programming, and Noncommunicable Diseases: Focus on Human Studies

Rodney R Dietert [1]

Affiliations + expand

PMID: 26556429 PMCID: PMC4590951 DOI: 10.1155/2014/867805

FULL TEXT LINKS

WILEY Free Full Text

FREE Full text PMC

ACTIONS

Cite

Collections

Razvojna imunotoksičnost (DIT) zajema okoljsko povzročeno motnjo normalnega imunskega razvoja s škodljivim izidom.

K DIT lahko prispevajo številni kemični, fizikalni in psihološki dejavniki.

Kot osrednja komponenta razvojnih izvorov bolezni pri odraslih je DIT povezan s tremi pomembnimi koncepti, ki obsegajo zdravstvena tveganja skozi vse življenje:

(1) Barkerjevo hipotezo, ki povezuje prenatalni razvoj z boleznimi v poznejšem življenju,

(2) higiensko hipotezo, ki povezuje novorojenčke in dojenčke s tveganjem za bolezni v poznejšem življenju, in

(3) fetalnim programiranjem in epigenetskimi spremembami, ki lahko vplivajo tako v poznejšem življenju kot na prihodnje generacije.

V kontekstu imunotoksičnosti v razvojnem obdobju (DIT) gre za preučevanje hipoteze, da je imunski sistem v razvoju bolj dovzeten za kemijske motnje kot imunski sistem odraslih osebkov.

Z vidika regulative obstaja bojazen, da bi standardna študija imunotoksičnosti, izvedena na odraslih živalih, spregledala morebitno večjo dovzetnost, povezano s kritičnimi fazami razvoja imunskega sistema.

Dovzetnost se lahko kaže kot

- **kvalitativna razlika** (npr. prizadetost imunskega sistema v razvoju, medtem ko imunski sistem odraslih ni prizadet),
- **kvantitativna razlika** (npr. imunski sistem v razvoju je prizadet pri nižjih odmerkih kot imunski sistem odraslih) ali
- **časovna razlika** (npr. učinki na imunski sistem v razvoju so dolgotrajnejši od tistih, ki jih opazimo pri imunskem sistemu odraslih).

Tovrstne razlike med imunskim sistemom v razvoju in imunskim sistemom odraslih so znanstveno potrjene.

Kakšne prednosti ponuja testiranje DIT v primerjavi s testiranjem na odraslih?

## Pokritost kritičnih razvojnih oken:

DIT posebej zajema več kritičnih oken razvoja imunskega sistema, s čimer se poveča občutljivost za odkrivanje potencialnih imunotoksičnih učinkov, ki bi jih testiranje pri odraslih lahko spregledalo.

## Prilagodljivost in integracija:

- Možnost preučevanja različnih razvojnih obdobij glede na potrebe
- Možnost izvedbe integriranih študij (npr. OECD 443 EOGRTS) s sočasnim ovrednotenjem drugih končnih točk
- Možnost ocenjevanja občutljivosti drugih sistemov v razvoju, kot sta endokrini ali živčni sistem

## Celovita ocena:

če se izvede DIT, ni potrebe po ločeni imunotoksikološki študiji z odraslimi živalmi, kar kaže na celovito naravo DIT.

Glavna prednost testiranja DIT je sposobnost prepoznavanja imunotoksičnih učinkov med ranljivimi razvojnimi fazami, ki morda niso očitni pri testiranju odraslih.

# Splošna priporočila za testiranje DIT

Upoštevati je treba tako trajne kot prehodne učinke.

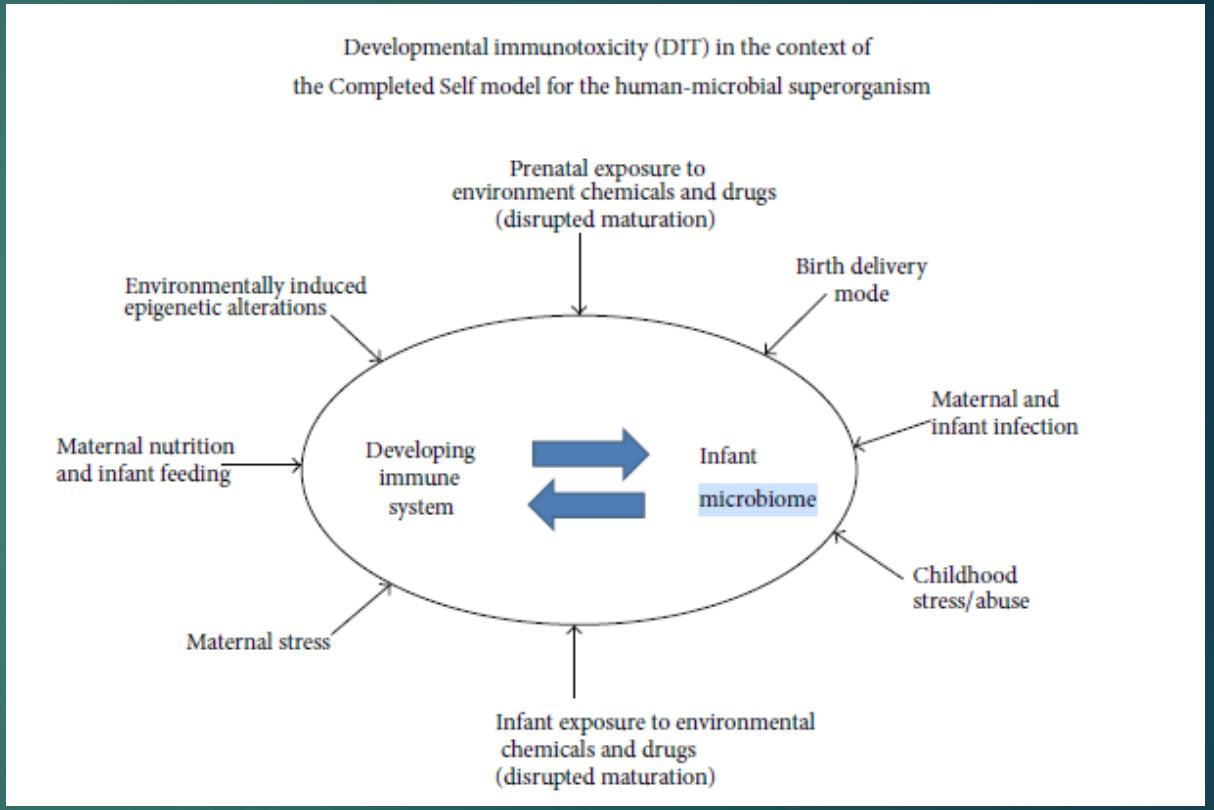
V okviru standardne zasnove študije je treba oceniti vse kritične faze razvoja imunskega sistema; če se pojavijo učinki, je treba določene faze podrobneje raziskati.

Protokol za ocenjevanje DIT bi se lahko razširil na mladostnike in mlade odrasle, saj je ključnega pomena, da se izpostavljenost nadaljuje, dokler ni mogoče oceniti morebitnih učinkov na imunski sistem.

Obstoječe *in vitro* metode imajo nekatere omejitve, vključno z dejstvom, da morda ne zajamejo kompleksnih celičnih interakcij, ki potekajo v okolju *in vivo*.

Paradigma *celovitega jaza* služi modelu v katerem morata imunski sistem in mikrobiom dojenčka sočasno dozorevati – brez motenj ali posegov – da se zmanjšajo zdravstvena tveganja v kasnejšem življenju. Model zajema okoljske dejavnike tveganja, za katere je znano, da povzročajo motnje pred in po rojstvu.

Neprekinjene celične linije niso fiziološki ekvivalenti primarnih celic, a so se mnoge izkazale za veljavne nadomestke, vendar pa zahtevajo ustrezno karakterizacijo za natančno ponazoritev normalnih imunoloških odzivov in funkcij.



NIJZ
Nacionalni inštitut za javno zdravje

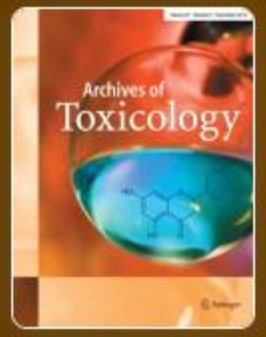


# From animal models to NAMs: a paradigm shift in developmental immunotoxicity testing

Review Article | Open access | Published: 13 May 2026

Volume 100, pages 3819–3840 (2026) Cite this article

You have full access to this open access article

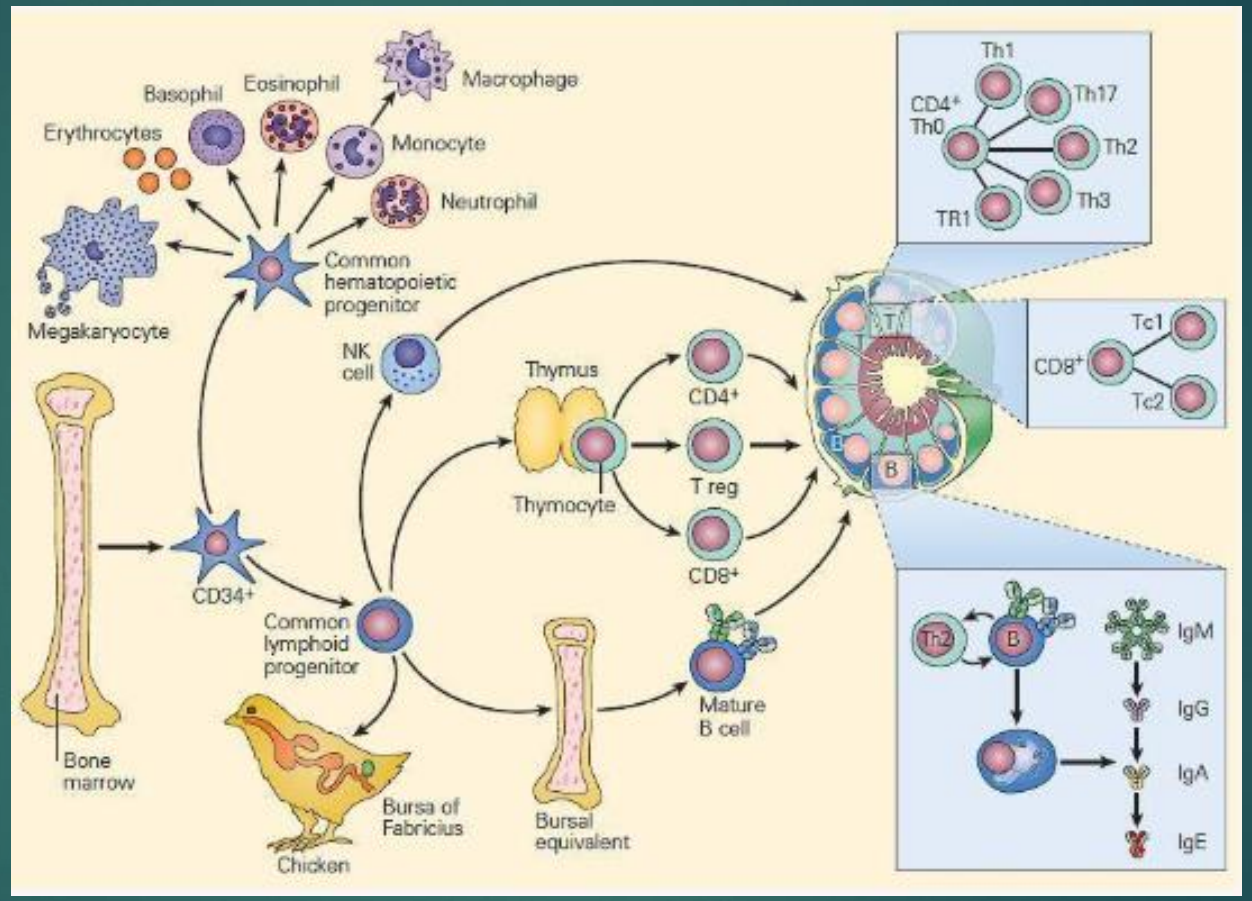



Archives of Toxicology

Aims and scope →

Submit manuscript →

# Shematski prikaz ontogeneze imunskega sistema




https://www.immunopaedia.org.za/immunology/basics/2-ontogeny-of-the-immune-system/ Povzeto z dovoljenjem iz: Bellanti, JA (ur.). Immunology IV: Clinical Applications in Health and Disease. I Care Press, Bethesda, MD,

# Pomembna novejša dognanja

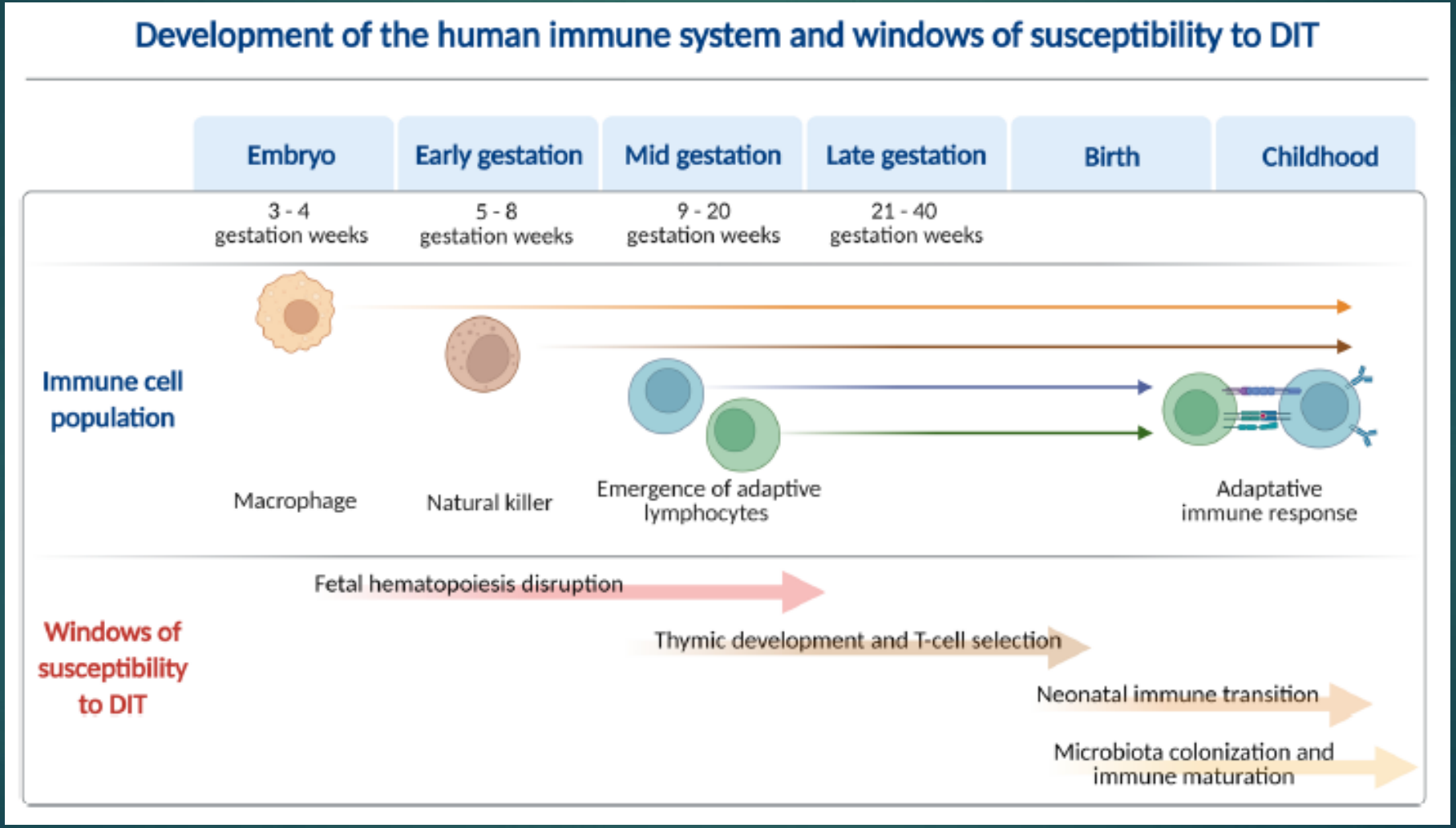
Limfoidni progenitorji, ki izvirajo iz rumenjakove vrečke (YS), se v človeških zarodkih pojavijo pred hematopoetskimi matičnimi celicami (HSC) (Ni et al. 2025).

**Sekvenciranje RNK na ravni posameznih celic** (**scRNA-seq** – *single-cell RNA sequencing*) vzorcev plodov, novorojenčkov in odraslih je pokazalo:

- človeške hematopoetske matične in progenitorske celice (HSPC, Haematopoietic stem-progenitor cells) so v drugi polovici fetalnega razvoja podvržene postopnim spremembam v izražanju genov, kar na ravni celične populacije vodi do transkripcijskega profila, ki se postopoma razvija (Bunis et al. 2021).

- Fetalne celice T so podvržene časovno usklajenim in usmerjenim spremembam v izražanju genov, ki verjetno določajo delovanje celic T v posamezni razvojni fazi; slednje nakazuje, da namesto ločenih, prekrivajočih se valov fetalne in odrasle hematopoeze, enoten oddelek HSPC doživlja postopne in neprekinjene spremembe v izražanju genov (Burt & McCune 2023).

Pregled časovnega razvoja človeškega imunskega sistema in glavnih obdobij občutljivosti za razvojno imunotoksičnost (DIT)

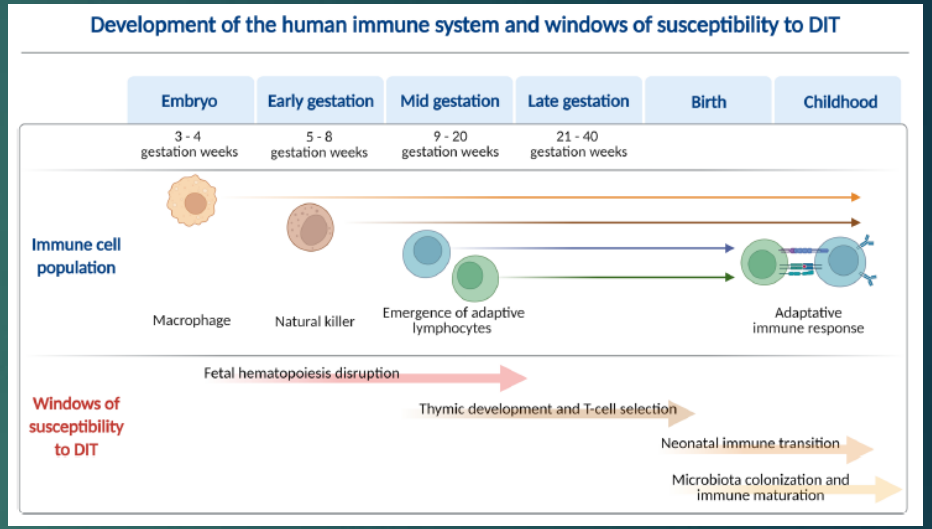


Zorenje imunskega sistema poteka prek zaporedja strogo nadzorovanih razvojnih faz, ki vključujejo določanje in proliferacijo hematopoetskih matičnih celic (HSC), naselitev in selekcijo celic v priželjcu ter vzpostavitev perifernega repertoarja celic T in B.

Vsaka od teh faz predstavlja obdobje povečane ranljivosti, v katerem lahko izpostavljenost tujim snovem povzroči dolgotrajne spremembe v imunski zmožnosti, toleranci in regulaciji (Dietert 2014).

Zato je treba skrbno preučiti izpostavljenost okoljskim onesnaževalom, zdravilom ali prehranskim neravnovesjem med nosečnostjo, v zgodnjem poporodnem obdobju in v dojenčkovem obdobju, saj so ta razvojna obdobja še posebej občutljiva za motnje.

Vse več dokazov kaže, da lahko škodljivi vplivi v teh kritičnih obdobjih usmerijo razvoj imunskega sistema vse do odrasle dobe ter vplivajo na dovzetnost za okužbe, alergije, avtoimunske bolezni in druge imunske odzive (WHO, 2012).



# Zaključki povezani z imunskim sistemom v razvoju

Imunski sistem v razvoju je dovzetnejši za učinke ksenobiotikov – od katerih so mnogi lahko imunotoksični, v primerjavi z imunskim sistemom odraslih.

Imunotoksičnost v obdobju razvoja (DIT) lahko privede do sprememb v nastajanju in delovanju imunskega sistema v kritičnih razvojnih obdobjih, kar lahko vpliva na zdravje skozi celotno življenje. To poudarja potrebo po razvoju orodij za testiranje kemikalij s tovrstnimi učinki, kar bi omogočilo učinkovitejše raziskovanje in boljše razumevanje DIT.

Toksikologija trenutno doživlja temeljito preobrazbo, ki jo narekujeta etična odgovornost in potreba po modelih, ki bolje odražajo človeško biologijo.

Osrednji del tega razvoja je uveljavitev načela 3R (Replacement, Reduction, and Refinement), ki je spodbudilo razvoj in uvajanje metodologij novega pristopa (NAM).

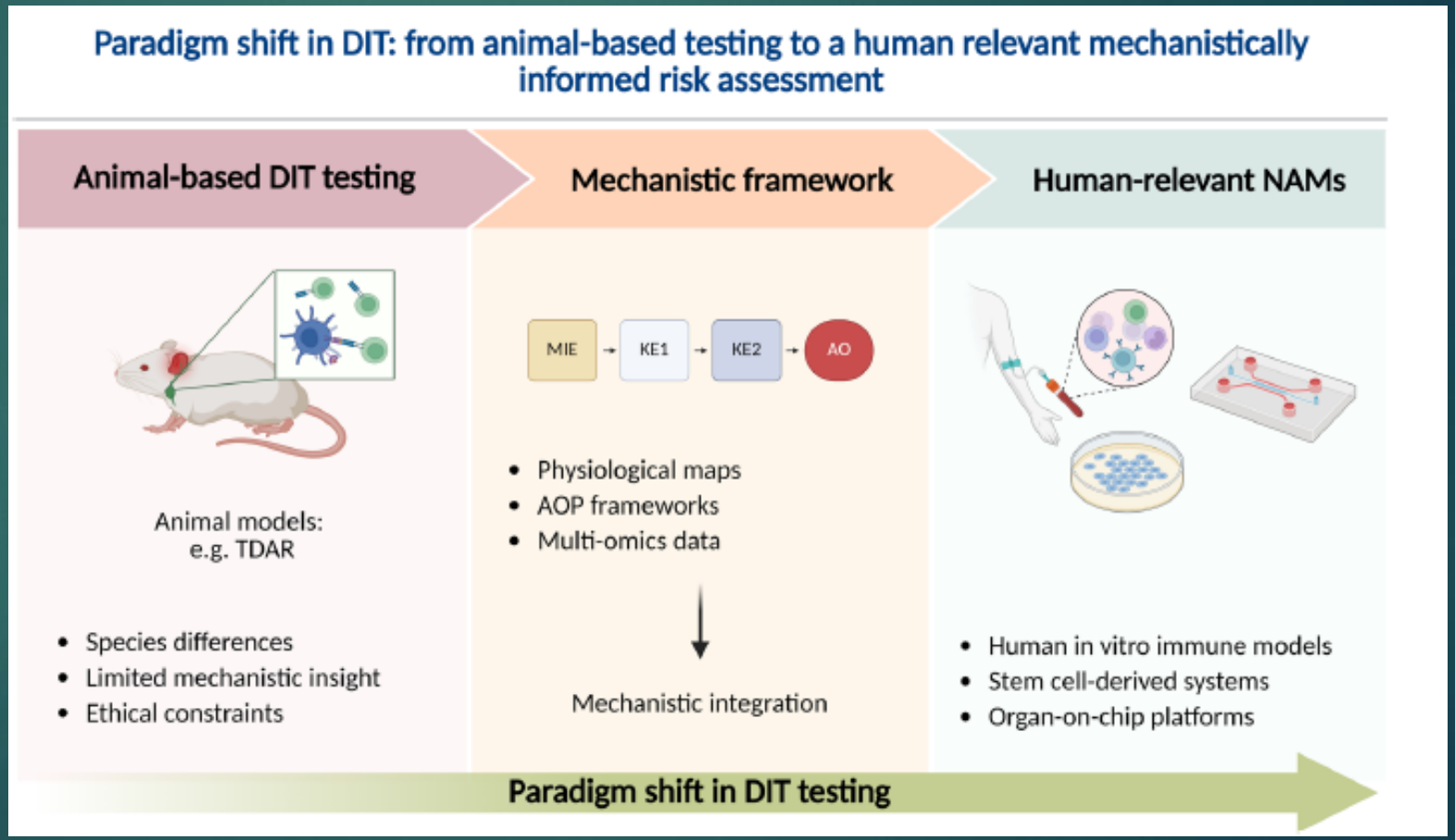
Te vključujejo vse širši nabor orodij *in silico*, *in chemico* in *in vitro*, zasnovanih za zmanjšanje odvisnosti od poskusov na živalih ob hkratnem povečanju napovedne moči (Johnson et al. 2025) pri razvoju napovednih orodij za uporabo v regulativne in raziskovalne namene.

# Pomen in izzivi testiranja DIT

Podatki testiranja DIT so bistveni za regulatorne odločitve zlasti v predporodni in perinatalni fazi, TODA:

- Podatki DIT so redki v primerjavi s podatki za večino drugih apikalnih končnih točk, saj se podatki DIT zahtevajo le v nekaj primerih ob registraciji kemikalij.
- Edina smernica za testiranje, ki vključuje testiranje DIT, je je OECD TG Razširjena enogeneracijska študija reproduktivne toksičnosti (EOGRTS; TG 443), v kateri se ocenjujejo učinki na frekvence subpopulacij limfocitov (celice T, celice B, celice CD4+ T, celice CD8+ T in celice NK), medtem ko se imunsko funkcionalne končne točke ne ocenjujejo.
- V omejenem številu primerov je v EOGRTS vključena tako imenovana kohorta 3. Ta kohorta ocenjuje učinke izpostavljenosti na odziv protiteles, odvisnih od celic T (TDAR, T-cell-dependent antibody response).
- Dodatek kohorte 3 k EOGRTS temelji na sprožilcih, pridobljenih iz (a) presejalnih testov za toksičnost za razmnoževanje in razvoj: TG 421/422, (b) 28- in 90-dnevnih študij oralne toksičnosti pri odraslih živalih: TG40 7/408 ali (c) javno dostopne literature.

**Premik paradigme – od pristopov, ki temeljijo na živalih, k pristopom DIT, ki temeljijo na metodah NAM**
je opredeljen s prehodom k mehanističnim, za ljudi relevantnim in integrativnim metodologijam, ki se gradijo na okviru poti s škodljivim izzidom AOP (Adverse Outcome Pathway).




Ustvarjeno v BioRenderju. Iulini, M. (2026) https://BioRender.com/5vrup11

# Kako lahko preučujemo DIT *in vitro*?

*In vitro* testi, ki se tradicionalno uporabljajo za imunotoksičnost pri odraslih, so bili predlagani kot presejalni v razvojnih kontekstih (OECD 2022).

Zagotovijo dragocene vpoglede v osnovno prepoznavanje nevarnosti, a je pri ekstrapolaciji rezultatov na zgodnje življenjske faze potrebna previdnost.

Razvijajoči se imunski sistem kaže povečano občutljivost na razvojne imunotoksične snovi, standardni pragovi za odrasle pa lahko podcenjujejo tveganja v kritičnih obdobjih imunskega zorenja.

Glede na kompleksnost imunskega razvoja je en sam test še vedno malo verjeten. Namesto tega se NAMi vse bolj vključujejo v večstopenjske strategije testiranja, ki se začnejo s pristopi *in vitro* in *in silico*.

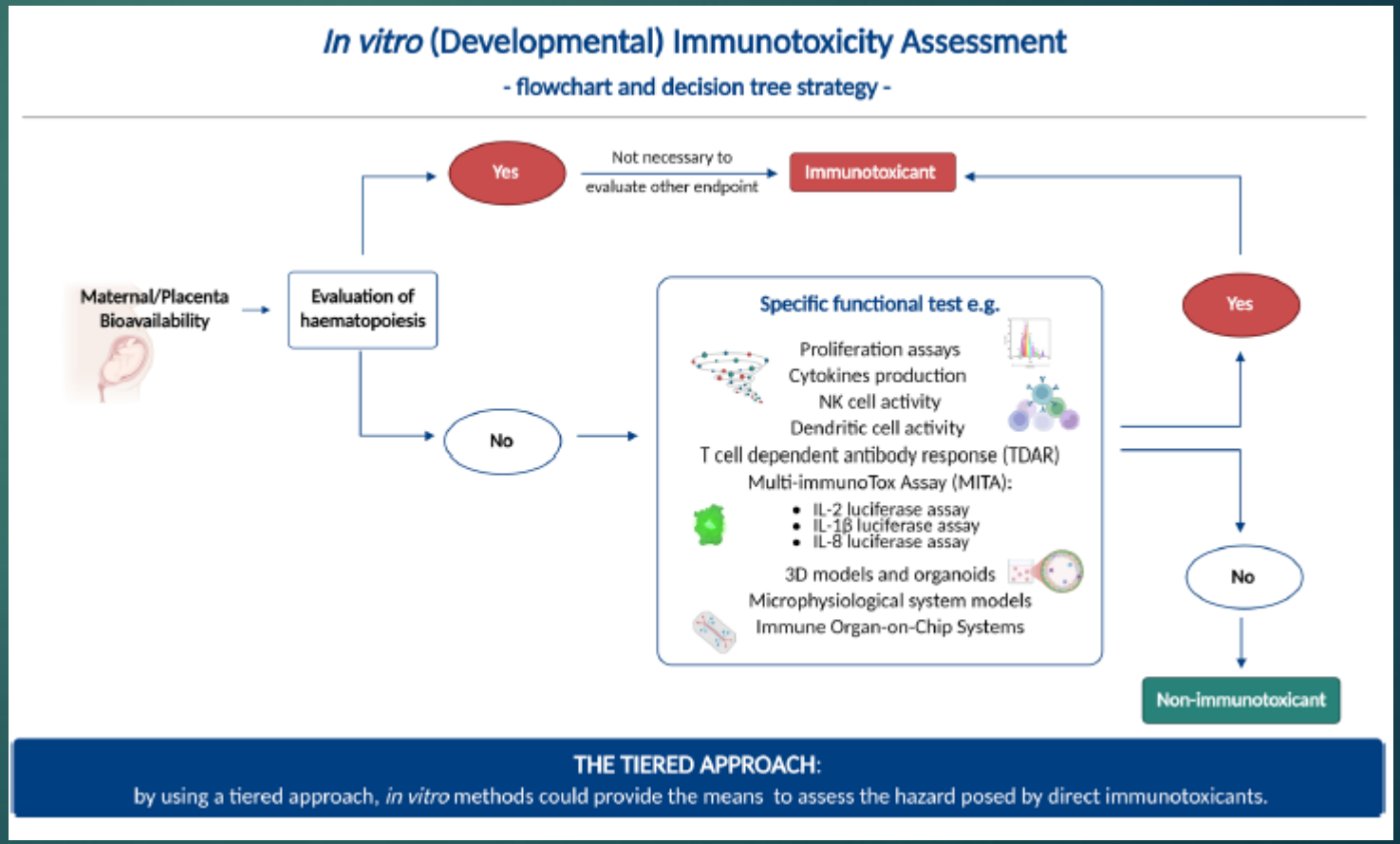
Fiziološki zemljevidi in AOP zagotavljajo mehanistično osnovo za izbiro NAM, ki bodo vključeni v baterijo testov. Namen je zajeti tako imunosupresivne učinke kot tudi neprimerno imunsko aktivacijo, kot je senzibilizacija kože.

V OECD TG je bilo vključenih več metod, vključno s testi IL-2 Luc in IL-2 Luc LTT (TG 444A), ki so zasnovani za odkrivanje imunosupresivne aktivnosti *in vitro*, čeprav je njihova uporabnost za DIT še vedno predmet razprav (Johnson et al. 2025; OECD 2022).

OECD dokument (2022) poudarja potrebo po nizu dopolnilnih testov, namesto da bi se zanašali na eno samo končno točko. Ta večanalitski pristop povečuje robustnost ocenjevanja imunotoksičnosti in podpira oceno tveganja, ki je bolj relevantna za človeka, zlasti v kontekstu razvojne izpostavljenosti.

Diagram poteka prikazuje pristop z odločitvenim drevesom:

- začetek je določanje biološke razpoložljivosti na ravni matere in posteljice ter vrednotenje hematopoeze,
- po potrebi sledijo ciljni funkcionalni imunski testi
- na podlagi rezultatov se snovi razvrstijo kot imunotoksične ali neimunotoksične.



## Mikrofizioloških sistemi

Te tehnologije skupaj predstavljajo temeljni kamen premika paradigmeproti strategijam za testiranje DIT, ki so relevantne za ljudi ter mehanistično utemeljene in etično vzdržne (Nandre & Terse 2025; Rupar et al. 2024).
Bolje zajemajo kompleksnost imunskega razvoja in njegove motnje, ki jih povzročajo ksenobiotiki.

MPS so napredne *in vitro* platforme, zasnovane za posnemanje vidikov fiziologije in delovanja človeških organov v nadzorovanem, dinamičnem okolju.

MPS združujejo strukturne, biokemijske in mehanske signale, kar omogoča zvestejšo simulacijo kompleksnih procesov, kot so diferenciacija, migracija in komunikacija imunskih celic (Kwee et al. 2023; Staumont et al. 2025).

V kontekstu imunotoksičnosti, povzročene z zdravili, so MPS še posebej obetavni, saj omogočajo modeliranje kritičnih obdobij zorenja imunskega sistema, ki so *in vivo* (pri ljudeh) nedostopna, v študijih na živalih pa so slabo ponazorjena.

Z vključevanjem primarnih progenitorjev ali progenitorjev, pridobljenih iz matičnih celic, ti sistemi omogočajo raziskovanje tega, kako izpostavljenost ksenobiotikom moti usmerjanje celic v določeno razvojno linijo, vzpostavljanje tolerance ali medsebojno delovanje med imunskim sistemom in tkivi med razvojem (Johnson et al. 2025).

## Sistemi imunskih organov na čipu

Ponujajo možnost napovedovanja imunotoksičnosti potencialnih terapevtskih učinkovin z uporabo podatkov, ki so relevantni za ljudi; to je ključen korak k uspešnemu prenosu v klinično okolje in pridobitvi regulatornih odobritev.

Tehnični in biološki izzivi (Nandre & Terse 2025; Rupar et al. 2024; Shanti et al. 2021; Wang et al. 2023):

- ustrezno prilagajanje velikosti organov;
- izbira optimalnega števila in vrste celic;
- obvladovanje kompleksnosti sočasnega gojenja različnih vrst celic (ko-kulture);
- ter zasnova ustreznih perfuzijskih sistemov.

Proučevanje DIT prinaša dodatno raven kompleksnosti, saj mora model upoštevati obsežne spremembe v imunskem sistemu, ki se pojavljajo v različnih razvojnih obdobjih.

Modeli *organ na čipu* ponujajo nove možnosti, na primer za vključitev medsebojnega delovanja različnih organov, vendar je treba še raziskati, v kolikšni meri lahko ti modeli posnemajo kompleksno in dinamično medsebojno delovanje, značilno za imunotoksičnost v razvojnem obdobju.

## 3D-modeli in organoidi

Dvodimenzionalne kulture tkiva priželjca nudijo omejeno podporo timopoezi, medtem ko 3D-kulture strome bolje spodbujajo razvoj nezrelih celic T - natančneje posnemajo prostorsko organizacijo, stike med celicami ter signale iz mikrookolja, ki so potrebni za selekcijo in zorenje timocitov.

3D-model ohranja naravno morfologijo celic in omogoča raznolike interakcije med celično površino in okoliškim medijem, kar povečuje preživetje in proliferacijo celic.

Kulture organov fetalnega priželjca so uveljavljeni modeli, ki posnemajo ključne vidike razvoja celic T v priželjcu, vključno s pozitivno in negativno selekcijo ter vzpostavitvijo tolerance celic T prek interakcij z lastnimi molekulami glavnega kompleksa histološke skladnosti in endogenimi antigeni.

Ti modeli so bili uspešno vzpostavljeni na različnih platformah, vključno s sistemi hranilnih celic OP9-DL1/DL4 in MS5-DL1/DL4, ki podpirajo razvoj celic T *de novo* iz matičnih celic.

Kulture ponovno agregiranih tkiv priželjca in kulture organov fetalnega priželjca so odigrale pomembno vlogo pri modeliranju zgodnjih dogodkov v priželjcu.

## 3D-modeli in organoidi

Zagotavljajo dragocen vpogled v zgodnji imunski razvoj in pomagajo zmanjšati odvisnost od živalskih modelov pri raziskavah imunotoksičnosti (Anderson et al. 2007).

Nedavno je bil vzpostavljen miniaturiziran pristop za proizvodnjo timusnih organoidov iz mišjih fetalnih timusnih celic, ki olajša zavezo in razvoj T-celic, ponuja bistvene strukturne in funkcionalne značilnosti nativnega timusa in je primeren za slikanje v živo ter za srednje do visoko zmogljive aplikacije (Major et al. 2025).

Pomemben izziv ostaja natančna replikacija kompleksnih interakcij limfne strome v različnih funkcionalnih nišah priželjca.

Do sedaj ni uporabe za oceno DIT *in vitro*. Obetavna prilagoditev teh modelov je vključitev človeških epitelijskih celic priželjca in stromalnih celic, bodisi primarnih bodisi pridobljenih iz induciranih pluripotentnih celic (iPSC).

Bodoči modeli bodo omogočili modeliranje različnih funkcionalnih niš znotraj človeškega priželjca, kar odpira nove možnosti za DIT *in vitro*.

**Poglobljeno imunsko profiliranje in pristopi sistemske imunologije**
(Nygaard et al. 2021; Ronsmans et al. 2022; Tursi et al. 2024).

Visokodimenzionalno imunsko profiliranje zajema kompleksnost imunskega sistema s hkratnim ocenjevanjem številnih celičnih populacij, stanj aktivacije in funkcionalnih označevalcev.

Zagotavljajo mehanistični vpogled v imunske poti in odzive, ki jih moti izpostavljenost imunotoksičnim snovem.

Integracija visokodimenzionalnega imunskega profiliranja z epidemiološkimi podatki in ciljno usmerjenimi eksperimentalnimi študijami *in vitro* ima potencial za premostitev povezav med izpostavljenostjo in izidom z osnovnimi celičnimi in molekularnimi mehanizmi pri ustreznih ravneh izpostavljenosti.

S preučevanjem prekrivanj med imunskimi profili, povezanimi z razvojno izpostavljenostjo in neželenimi zdravstvenimi izidi, povezani s prenatalno izpostavljenostjo PFAS in oslabljeno imunsko funkcijo v zgodnjem otroštvu (Pennings et al. 2016), se lahko okrepijo dokazi o vzročnih povezavah.

Prispevajo k razvoju prihodnjih *in vitro* presejalnih testov za DIT in identifikaciji ključnih dogodkov za razvoj AOP.

# Izzivi pri napredovanju testiranja DIT

Imunski sistem igra osrednjo vlogo pri oblikovanju širokega spektra zdravstvenih izidov skozi vse življenje.

Kljub velikemu napredku pri razumevanju ontogeneze imunskega sistema in pri razvoju NAM, pomembnih za človeka, ostajajo vrzeli v znanju in metodološke vrzeli, ki skupaj ovirajo razvoj, standardizacijo in validacijo:

Omejeno je znanje o tem, kateri specifični imunski razvojni procesi in okna dovzetnosti so najbolj prizadeti in preko katerih mehanizmov.

Ta negotovost je tesno povezana z omejeno razpoložljivostjo referenčnih podatkov o ljudeh, ki opisujejo normalen imunski razvoj v prenatalnem in zgodnjem postnatalnem življenju.

V primerjavi z modeli pri glodalcih ostajajo nabori podatkov o ljudeh redki, razdrobljeni in pogosto izpeljani iz majhnih kohort ali oportunističnega vzorčenja, zaradi česar je težko: (i) določiti osnovne poti imunskega zorenja, (ii) prepoznati kritična okna dovzetnosti, (iii) preslikati celične in molekularne dogodke, bistvene za imunsko kompetenco, in (iv) razločiti normalno razvojno variabilnost od sprememb, ki jih povzročajo imunotoksične snovi.

**Čeprav je bilo objavljenih več NAM za DIT,**
**jih je le nekaj napredovalo v smeri validacije in regulativnega sprejetja.**

Pomembna ovira je omejena razpoložljivost referenčnih podatkov, relevantnih za človeka, ki jih je mogoče uporabiti za opredelitev neugodnih razmer in primerjalno analizo *in vitro* ugotovitev v različnih razvojnih fazah imunskega sistema.

Validacija NAMov za DIT ostaja izziv zaradi kompleksnosti imunske ontogeneze, specifičnosti imunskih procesov v posameznih življenjskih fazah in pomanjkanja uveljavljenih zlatih standardnih testov za številne razvojne imunske končne točke kar otežuje regulativno sprejetje.

Usklajevanje in standardizacija sta ključnega pomena za zagotovitev ponovljivosti in robustnosti.

Pričakuje se, da bodo integrirani pristopi (IATA) igrali ključno vlogo pri omogočanju regulativnega izvajanja NAM za DIT.

Ker DIT vključuje več razvojnih procesov in imunskih kompartmentov, bodo verjetno potrebne kombinacije dopolnjujočih NAMov, ki zajemajo različne ključne dogodke v imunskem razvoju.

Vzpostavitev mednarodno dogovorjenih testov, skupaj s preglednimi postopki interpretacije podatkov in merili izvedbe, bo zato bistvenega pomena za podporo regulativnemu sprejemanju.

# Uporaba za testiranje DIT za kemijsko varnost?

Te regulativne pomisleke poudarjata Strategija EU in dokumenti ECHA KARC (Key Areas of Regulatory Challenges), v katerih opredeljujejo DIT kot regulatorno potrebo in prednostno področje za nadaljnje raziskave (ECHA, 2025).

Pomembno je, da ta vrzel v znanju presega DIT, saj imunotoksičnost, ki jo povzročajo kemikalije, v vseh življenjskih fazah ostaja nezadostno opredeljena, trenutni pristopi testiranja pa ne morejo zaznati celotnega spektra imunsko povezanih škodljivih izidov.

Za podporo posebej ocene DIT je treba bolje opredeliti kritična obdobja razvoja imunskega sistema.

Trenutno znanje o fetalnem imunskem sistemu v veliki meri temelji na informacijah iz živalskih modelov.

Podatki se dopolnjujejo s podrobnimi značilnostmi človeških prenatalnih imunskih celic (Suo et al., 2022; Haniffa et al., 2025), ki skupaj z napredkom modelov na osnovi matičnih celic močno koristijo razvoju *in vitro* testov, ki se osredotočajo na človeka.

# Key Areas of Regulatory Challenges (ECHA, 2025).

## 2.1.2 Immunotoxicity



### Why further research is needed:

We need to understand when the human immune system is most sensitive to chemical exposure. More specifically we need to identify and characterise the effects on the foetus, developing children and adults.

### Regulatory needs:

Identify sensitive moments in the development of the human immune system. Identify available NAMs to address these effects and develop new NAMs where needed. Apply these NAMs to better regulate the adverse impact of these chemicals.

### Impact:

- Improve identification and regulation of immune-toxic substances.
- Support potential future development of dedicated CLP hazard classes for immuno-toxicity.

# Key Areas of Regulatory Challenges (ECHA, 2025).

**2.1.2.1. Identification of critical windows of development of the immune system**

**Why the topic is of relevance:** Developmental immunotoxicity is of concern because of an observed increase of diseases that are linked to the immune system (e.g., allergies, autoimmune diseases). Currently, assessment of possible developmental immunotoxicity effects is a standard information requirement at the highest tonnage level under REACH (i.e., for substances brought onto the European market above 1000 tonnes per year), in case a concern for immunotoxicity is observed in previously performed studies in adult animals (EOGRTS with cohort 3). As the concern for developmental immunotoxicity (and the request for further assessment of this effect) is based on data generated in adult animals, it is possible to miss substances causing immunomodulation in developing animals. As there is a lack of scientific consensus on the critical windows for the development of the immune system, further work is needed. Without this scientific understanding it is impossible to develop a NAM based battery to assess developmental immunotoxicity, even for screening or priority setting. Once those critical windows have been identified, a next step would be to assess what type of methods may already be available and whether those could be used (perhaps with further development and validation) for assessing developmental immunotoxicity in regulatory processes. Based on current state of science (mainly linked to academia-based research), there are multiple methods containing standard in vitro techniques, as well as new types of tissue cultures. **There is however only one NAM based technique with international approval for assessing immunotoxicity**, which hampers the inclusion of non-animal-based methods or test batteries into the regulatory system. Due to the general concern of this endpoint, it is important to have at least NAM based methods for priority setting or screening, to better decide on testing needs and to understand the potential risks of e.g., industrial chemicals for the developing immune system. Currently, developmental immunotoxicity is included under reproduction toxicity in CLP regulation. Discussions are ongoing to develop a specific hazard class for immunotoxicity (containing both adult and development immunotoxicity). Also for this purpose, it would be beneficial to have (more) NAMs available.
**Where it fits into the regulatory landscape**: this concerns basic research, which is needed to gain a better understanding of the scientific possibilities and regulatory applicability of new NAMs to address immunotoxicity. Depending on their applicability domain, the NAMs could be used for priority setting (better targeting of in vivo testing), support of read-across and possibly even for classification and labelling purposes.
**Short-term impact:** To identify critical windows in the development of the immune system and to analyse the NAM related methodologies that are already available. In case promising methods are not available, further consideration of development of NAMs is needed.
**Long-term impact**: To develop or validate a testing battery of NAMs for the assessment of developmental immunotoxicity to implement in a regulatory context e.g., screening, priority setting, supporting evidence, hazard identification or risk assessment.

DIT Alternatives Group - The Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing (jhsph.edu); F Miller, The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention; Curr Opin Immunol. 2023 9 OECD TG 444A: in vitro Immunotoxicity

DIT Alternatives Group - The Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing (jhsph.edu)

Sillé, F. C. M. (2025). Developmental Immunotoxicology - Alternative Methods. In *Comprehensive Toxicology* (pp. Vol5a:533-Vol5a:573). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95488-4.00189-3



JOHNS HOPKINS UNIVERSITY

Search

# Developmental Immunotoxicology - Alternative Methods

Fenna C.M. Sillé

*Research output: Chapter in Book/Report/Conference proceeding › Chapter*

Overview Fingerprint

## Abstract

Developmental immunotoxicology (DIT) is an expanding field focusing on how early-life exposures to environmental factors such as xenobiotics, chemicals, and pharmaceuticals can disrupt immune system development. This disruption can lead to a higher risk of long-term immune dysfunction, including asthma, allergies, autoimmune diseases, and susceptibility to infections. Understanding DIT is crucial because the developing immune system is more vulnerable compared to adults, especially during critical windows of development. These exposures can affect immune tolerance, differentiation, and the functional maturation of immune cells. Current DIT testing primarily relies on in vivo animal models, which have limitations such as species-specific differences in immune development and a lack of translatability to human health outcomes. In light of ethical considerations and the 3Rs (Replacement, Refinement, Reduction), alternative New Approach Methods (NAMs) for DIT testing are being explored. These include in vitro systems such as hematopoietic stem cell assays, thymic organoids, and organs-on-chips, which have the potential to mimic immune development more closely than animal models. In silico models and bioinformatics are also showing promise in predicting immune disruptions, offering a future direction for reducing reliance on animal testing. To ensure the reliability of DIT NAMs, validation criteria must be rigorously met, including ensuring relevance to human health, predictive accuracy, and regulatory acceptance. The field continues to face challenges, particularly in translating animal data to human health outcomes, but advances in technology, including AI and machine learning, are helping to refine DIT testing strategies. Future directions include optimizing NAMs for regulatory purposes and expanding our understanding of critical windows of immune vulnerability to better protect pediatric health.

# Projekt PARC DIT NAMs

Združuje 14 evropskih institucij za kartiranje ranljivih oken razvoja imunskega sistema in razvoj ustreznih NAMov.

Osredotoča se na zdravje ljudi, a nekateri pristopi bodo uporabni tudi v ekotoksikologiji.

**Podprojekt 1 (Baza znanja in kartiranje):** Pregleduje trenutno literaturo, opredeljuje kritična okna razvoja imunskega sistema in gradi fiziološki zemljevid razvijajočega se človeškega imunskega sistema.

**Podprojekt 2A-C (Razvoj in prilagoditev NAMs):** Ocenjuje obstoječe teste imunotoksičnosti za presejanje, določanje prioritet in navzkrižno branje, hkrati pa ustvarja nove in vitro NAMe z uporabo različnih modelov.

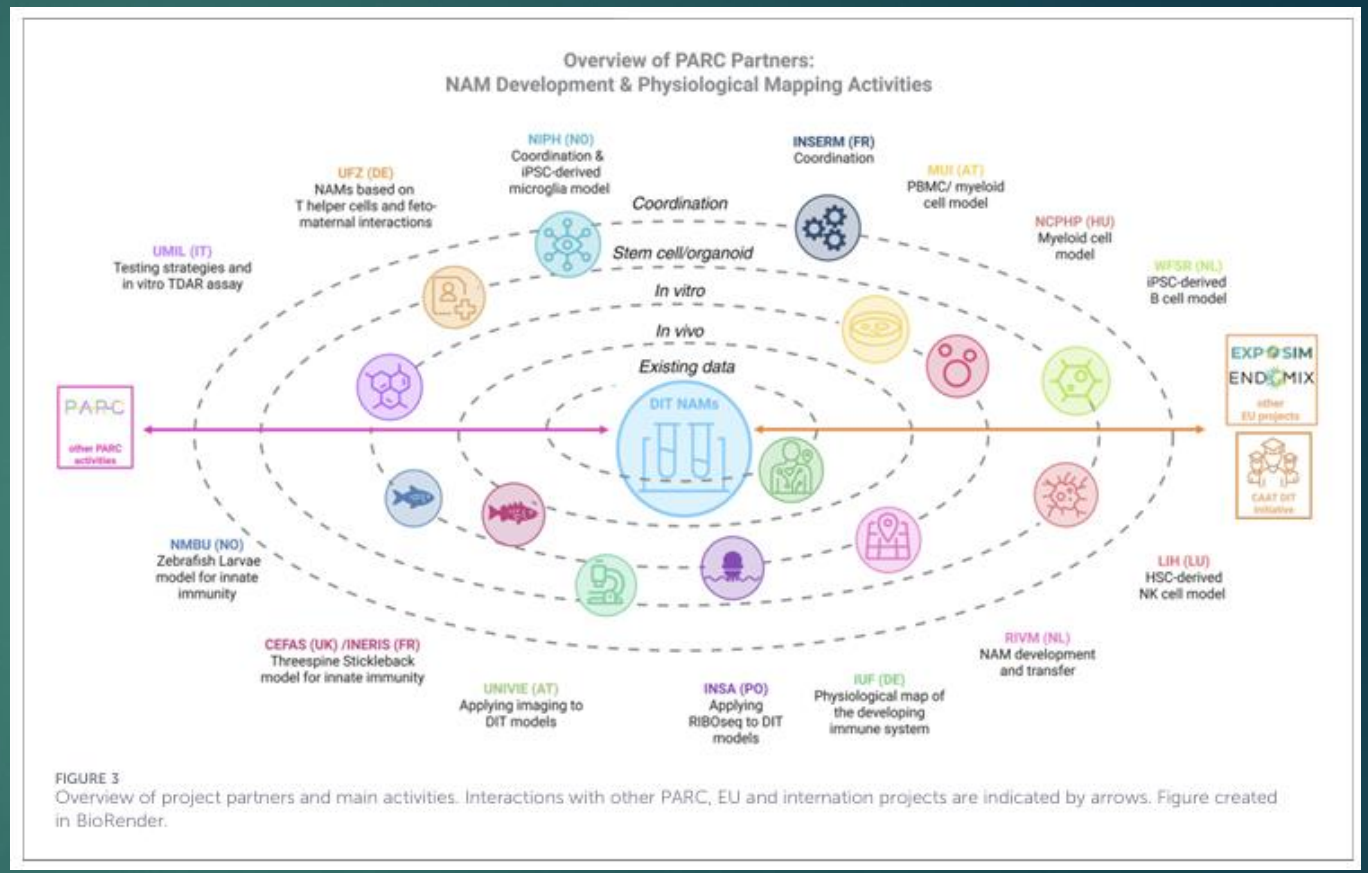



FIGURE 3
Overview of project partners and main activities. Interactions with other PARC, EU and internation projects are indicated by arrows. Figure created in BioRender.

Cilj projekta je razviti ustrezne NAM za izboljšanje regulatorne ocene tveganja imunotoksičnih kemikalij.

Sodelovanje z mednarodnimi pobudami bo okrepilo metodologije, ki obravnavajo razvojno imunotoksičnost in vplive kemikalij na imunske poti.

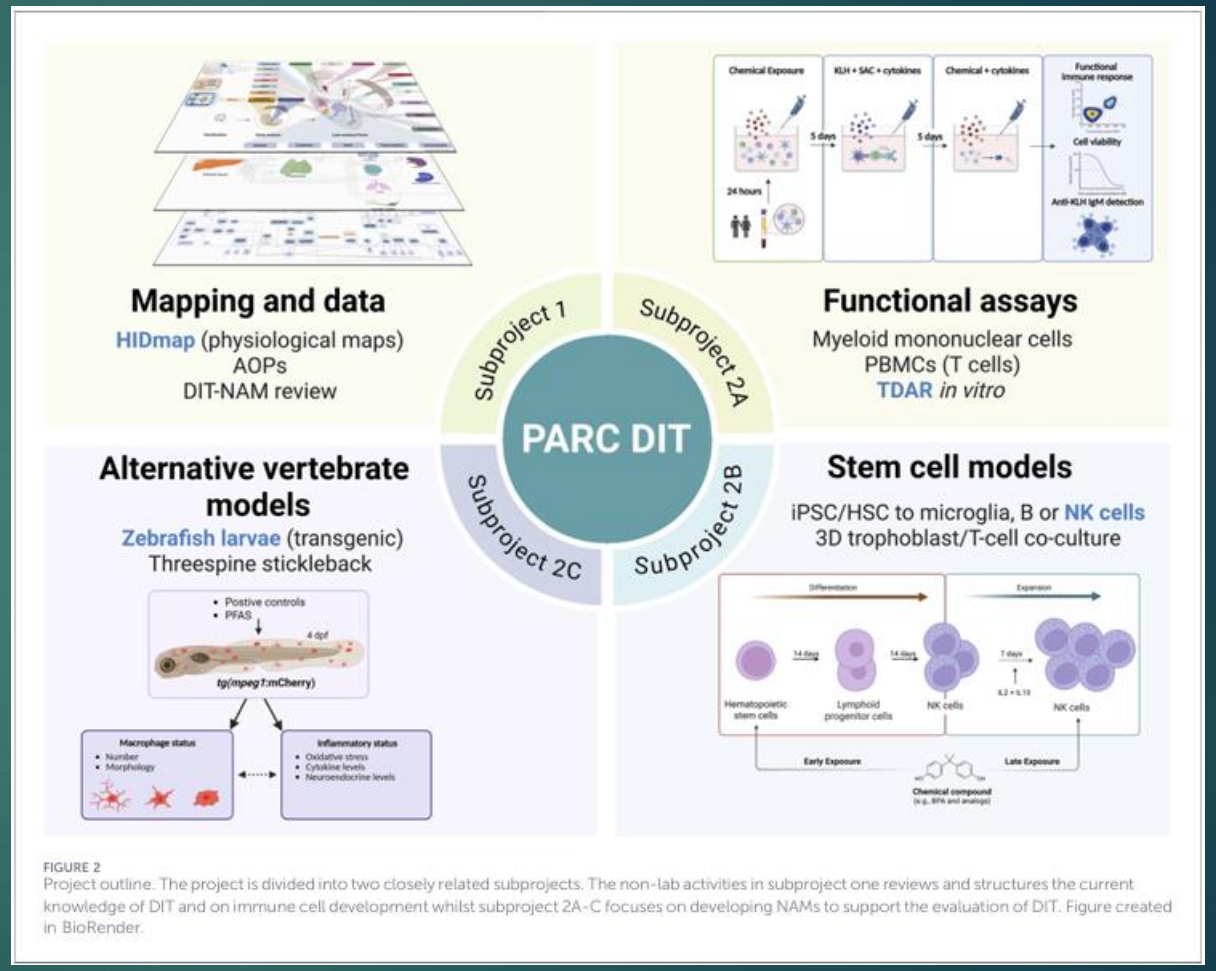



FIGURE 2
Project outline. The project is divided into two closely related subprojects. The non-lab activities in subproject one reviews and structures the current knowledge of DIT and on immune cell development whilst subproject 2A-C focuses on developing NAMs to support the evaluation of DIT. Figure created in BioRender.

EUROTOX 2026
VIENNA | AUSTRIA
13–16 SEPTEMBER 2026

**Developmental Immunotoxicity: Mechanistic Insights, Human-Relevant Models, and Translational Pathways**

**Julia Tigges** (IUF – Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Environmental Toxicants and the Brain, Germany); **Costanza Rovida** (1. TEAM mastery s.r.l. ; 2. CAAT EventsCAAT Events, Italy)

Razvijajoči se imunski sistem je med najbolj zapletenimi in ranljivimi biološkimi mrežami, ki ga oblikujejo genetsko programiranje in okoljski dejavniki, ki skupaj določajo dolgoročno odpornost ali dovzetnost za bolezni. Motnje v kritičnih razvojnih oknih lahko močno spremenijo imunsko delovanje, vendar razvojna imunotoksičnost (DIT) ostaja eno najmanj zastopanih področij pri ocenjevanju kemijske varnosti. Tradicionalne metode, ki temeljijo na živalih, zagotavljajo omejen vpogled v človeško imunsko ontogenezo, ne zajamejo starostno odvisne občutljivosti in niso primerne za sodobne zahteve po mehanistični natančnosti in etični odgovornosti.

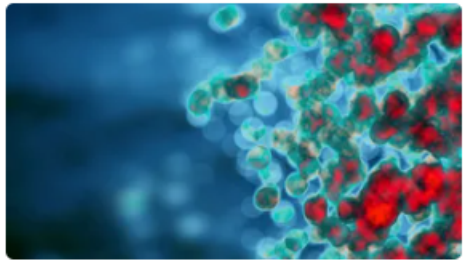
Prikazali so združena področja toksikologije, imunologije in bioinženiringa, da bi predstavili celostno perspektivo o prihodnosti testiranja DIT: opredelitvijo funkcionalnih meril, referenčnih spojin in standardov delovanja za metodologije novega pristopa DIT (NAMs); k naprednemu načrtu, ki opisuje znanstvene in regulativne poti do validacije testov, sprejetja s strani OECD in vključevanja novih tehnologij v oceno varnosti; predstavitev, kako napredni in vitro sistemi povzemajo zgodnjo imunsko diferenciacijo in delovanje; raziskavo imunskega razvoja na sistemski ravni s pomočjo mehanističnega kartiranja in okvirov za pot škodljivih izidov (AOP). Te predstavitve skupaj na novo opredeljujejo testiranje imunskega odziva kot temelj za oceno tveganja, pomembnega za človeka, in vseživljenjsko zaščito imunskega zdravja.

NIJZ
Nacionalni inštitut za javno zdravje




Spruck et.al (2026)

Published in



Frontiers in Immunology
Systems Immunology

7 impact factor 11.3 citescore

METHODS article

Front. Immunol., 09 July 2026
Sec. Systems Immunology
Volume 17 - 2026 | https://doi.org/10.3389/fimmu.2026.1741650

# HIDmap: a physiology-based map of human immune system development to support animal-free research and regulatory innovation

Fiziološko podprt HIDmap temelji na dejstvu,
da se razvoj človeškega imunskega sistema vzpostavi z zaporedjem strogo reguliranih procesov, ki se odvijajo v več embrionalnih in fetalnih organih.

Kljub obsežnim raziskavam se naše mehanistično razumevanje še vedno v veliki meri opira na živalske modele, ki pogosto nimajo translacijske natančnosti za človeško biologijo.

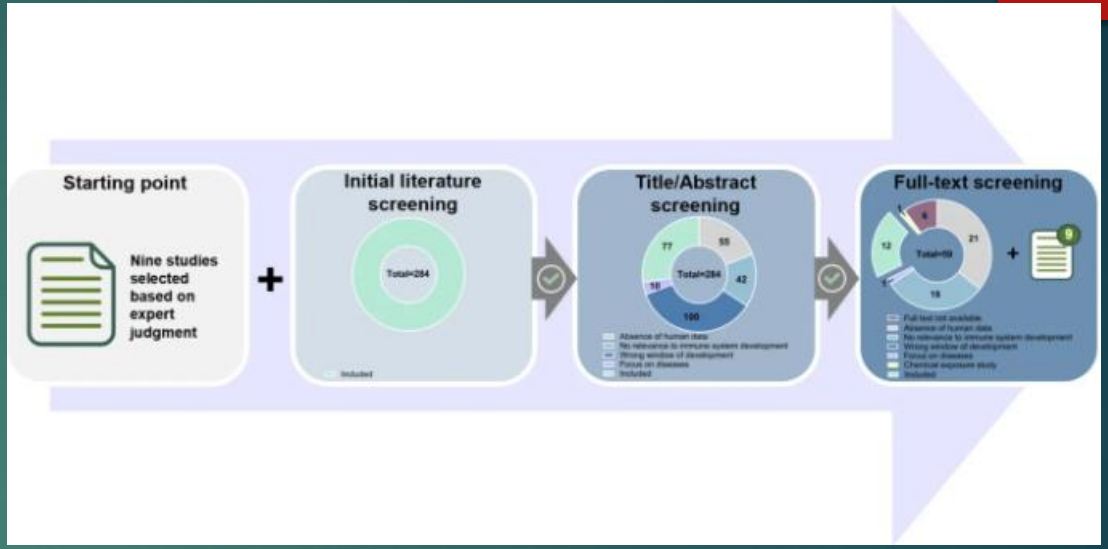
Ta vrzel je še posebej pomembna za razvojno imunotoksičnost (DIT), kjer je bila izpostavljenost okoljskim onesnaževalcem, kot so dioksini, PCB-ji in PFAS, v zgodnjem življenju povezana z dolgotrajno imunsko disfunkcijo, vključno z zmanjšano odzivnostjo otrok na cepiva.

Da bi odgovorili na to potrebo, so ustvarili Zemljevid razvoja človeškega imunskega sistema (HIDmap), kuriran digitalni vir, ki je skladen s standardi najdljivosti, dostopnosti, interoperabilnosti in ponovne uporabnosti (FAIR) in sistematično zajema prenatalno imunsko ontogenezo.

HIDmap združuje podatke, pridobljene iz literature, v modularno, triplastno strukturo, ki povezuje anatomske niše, migracijo celic in trajektorije diferenciacije v 24 organih.

Z vgradnjo HIDmap v okvir poti škodljivih izidov (AOP) so zgradili domnevni AOP, da bi pokazali, kako lahko zemljevid pomaga povezati molekularne začetne dogodke, povezane z izpostavljenostjo okolju – kot je aktivacija arilnih ogljikovodikovih receptorjev (AhR) – s ključnimi imunološkimi dogodki in neželenimi izidi v nadaljnjem toku.

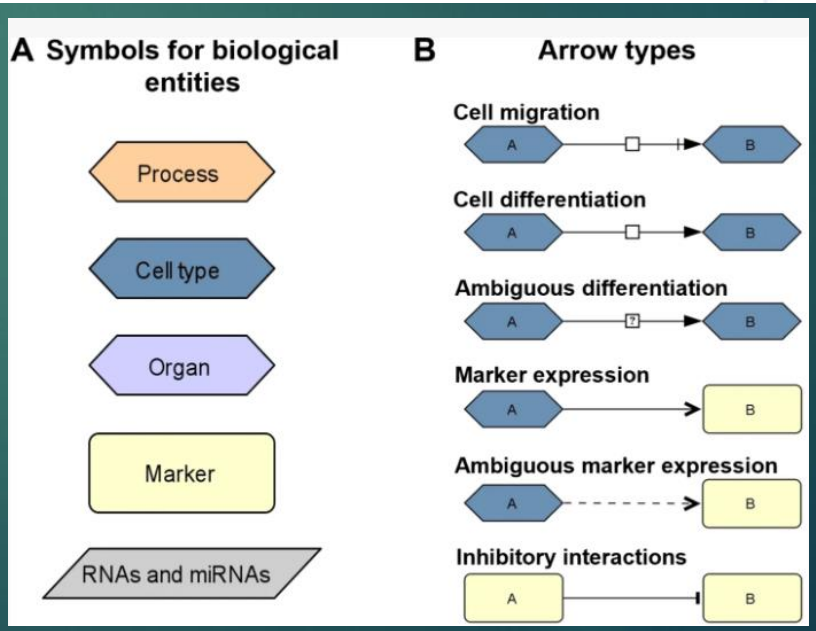
HIDmap združuje podatke, pridobljene iz literature, v modularno, triplastno strukturo, ki povezuje anatomske niše, migracijo celic in potek diferenciacije v 24 organih.




Uporablja barvno in simbolno kodiranje, ustvarjeno s CellDesignerjem.

(A) Barvna shema ponazarja različne biološke entitete.

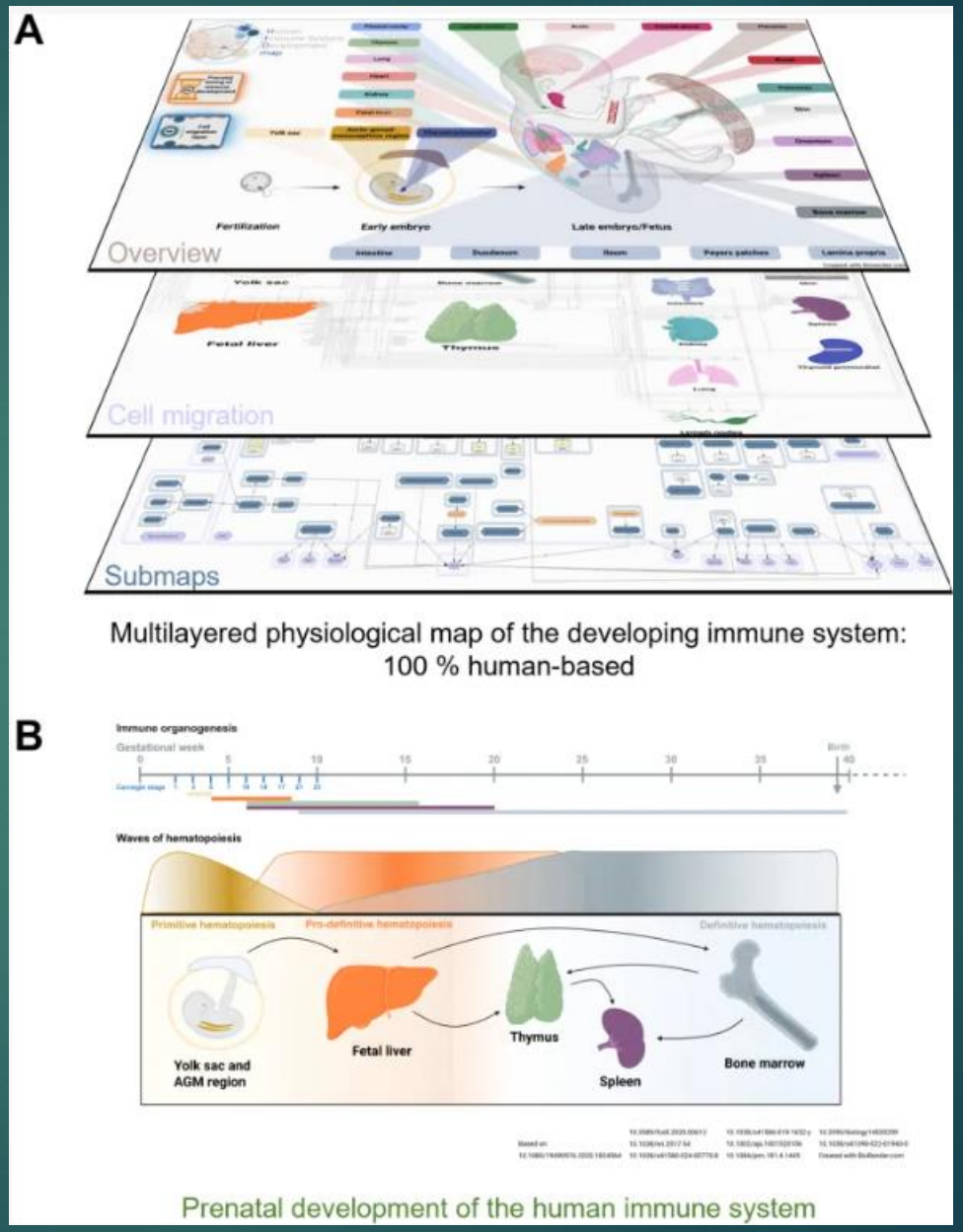
(B) Vrste puščic predstavljajo biološke odnose.



Prikaz struktura razvojnega zemljevida človeškega imunskega sistema (HIDmap).

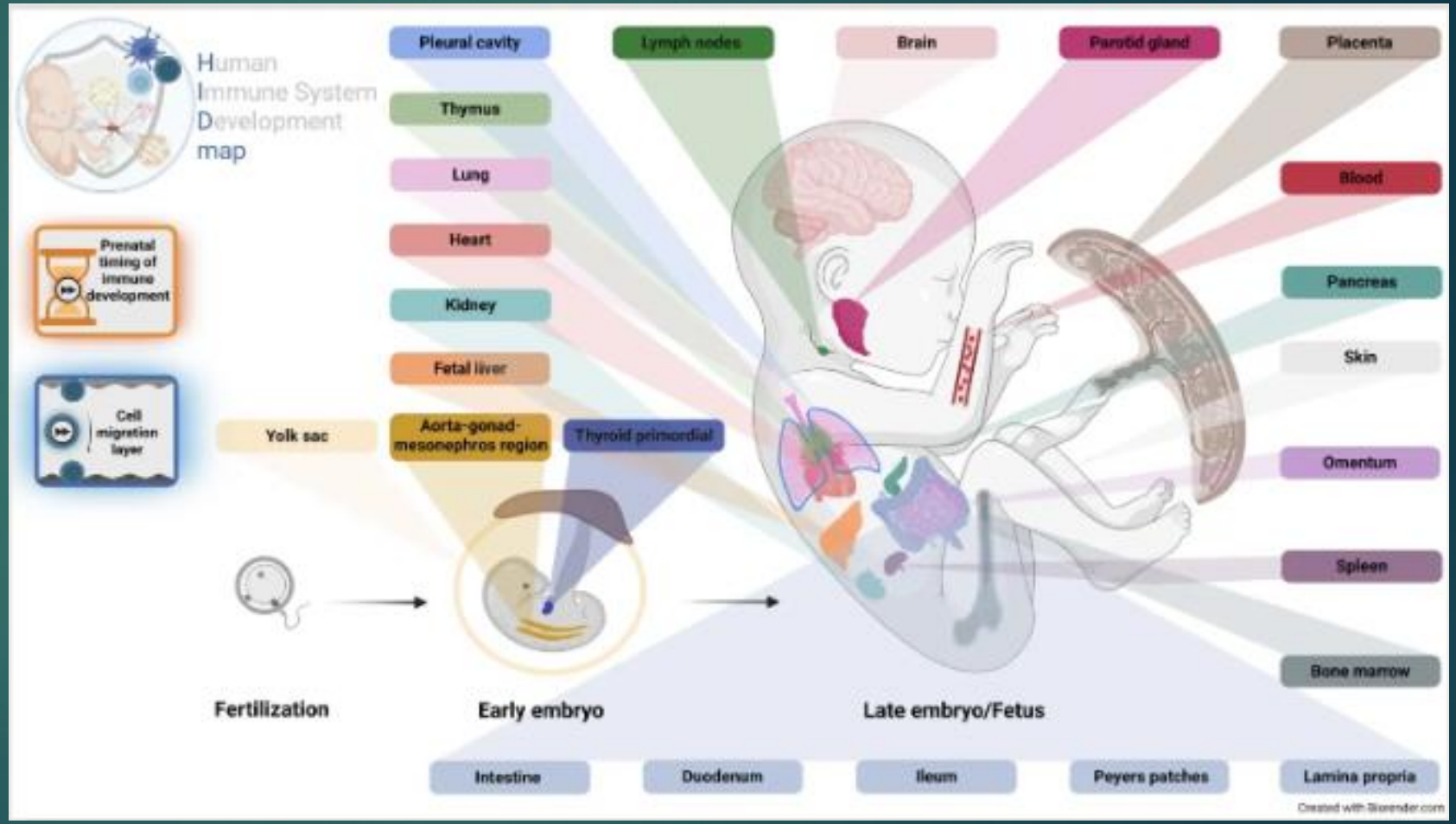
(A) Organizacija v tri hierarhične ravni biološke granularnosti.

(B) Prikaz prenatalnega razvoja imunskega sistema z imunsko organogenezo in valovi hematopoeze.



Posnetek (računalniškega) zaslona prikazuje uporabniški vmesnik zemljevida na platformi MINERVA, vključno z interaktivnimi funkcijami, kot so navigacijska orodja in funkcija iskanja, ki uporabniku omogoča iskanje določenih vrst celic ali komponent, ki ga zanimajo.

Celotna interaktivna različica zemljevida je dostopna preko https://immunedev.elixir-luxembourg.org/minerva/.

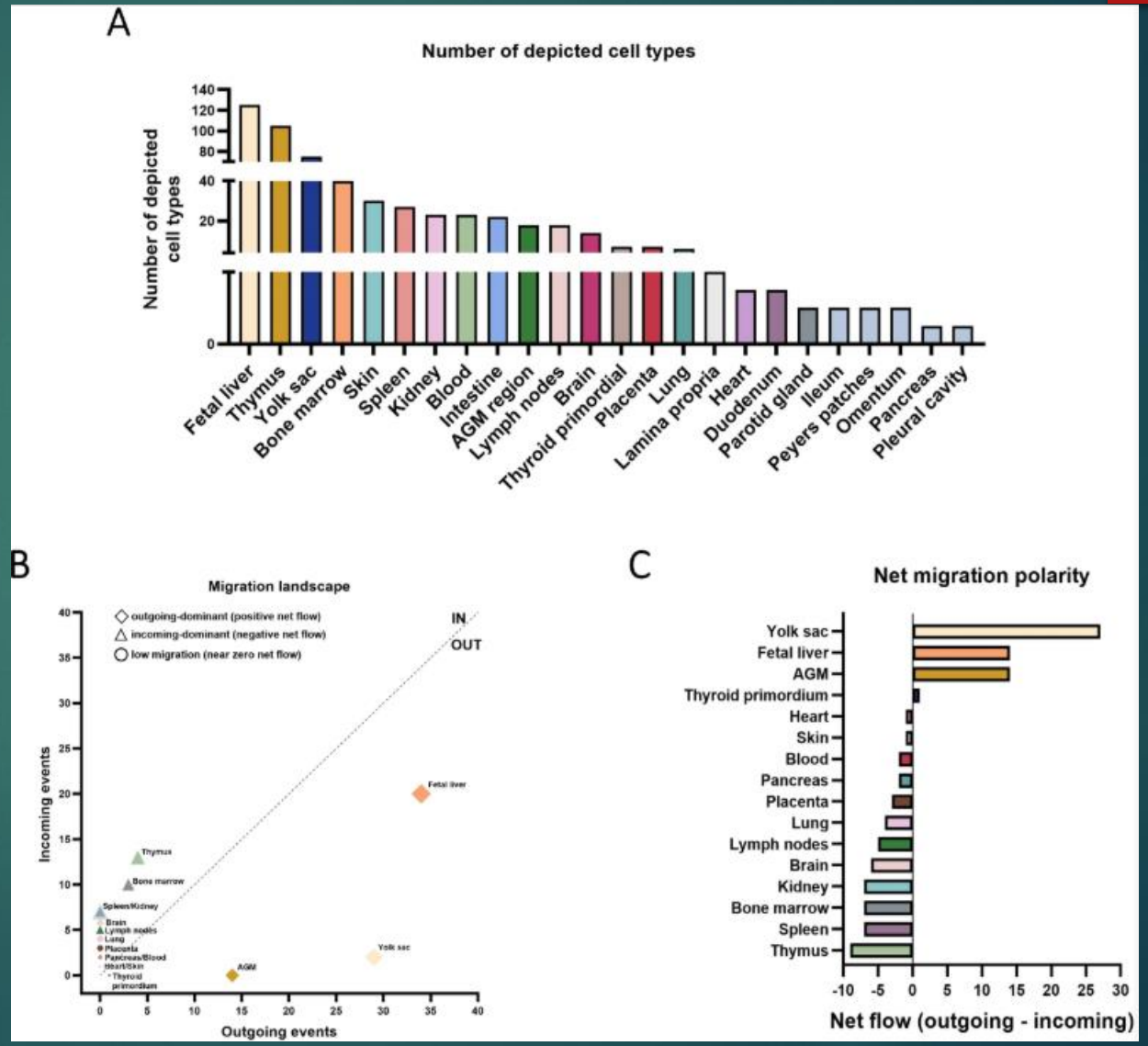


Prikaz pokritost organov *in utero* in polarnost migracije na zemljevidu HIDmap.

(A) Število prikazanih tipov imunskih celic na organ iz vseh naborih podatkov, vključenih v zemljevid HIDmap.

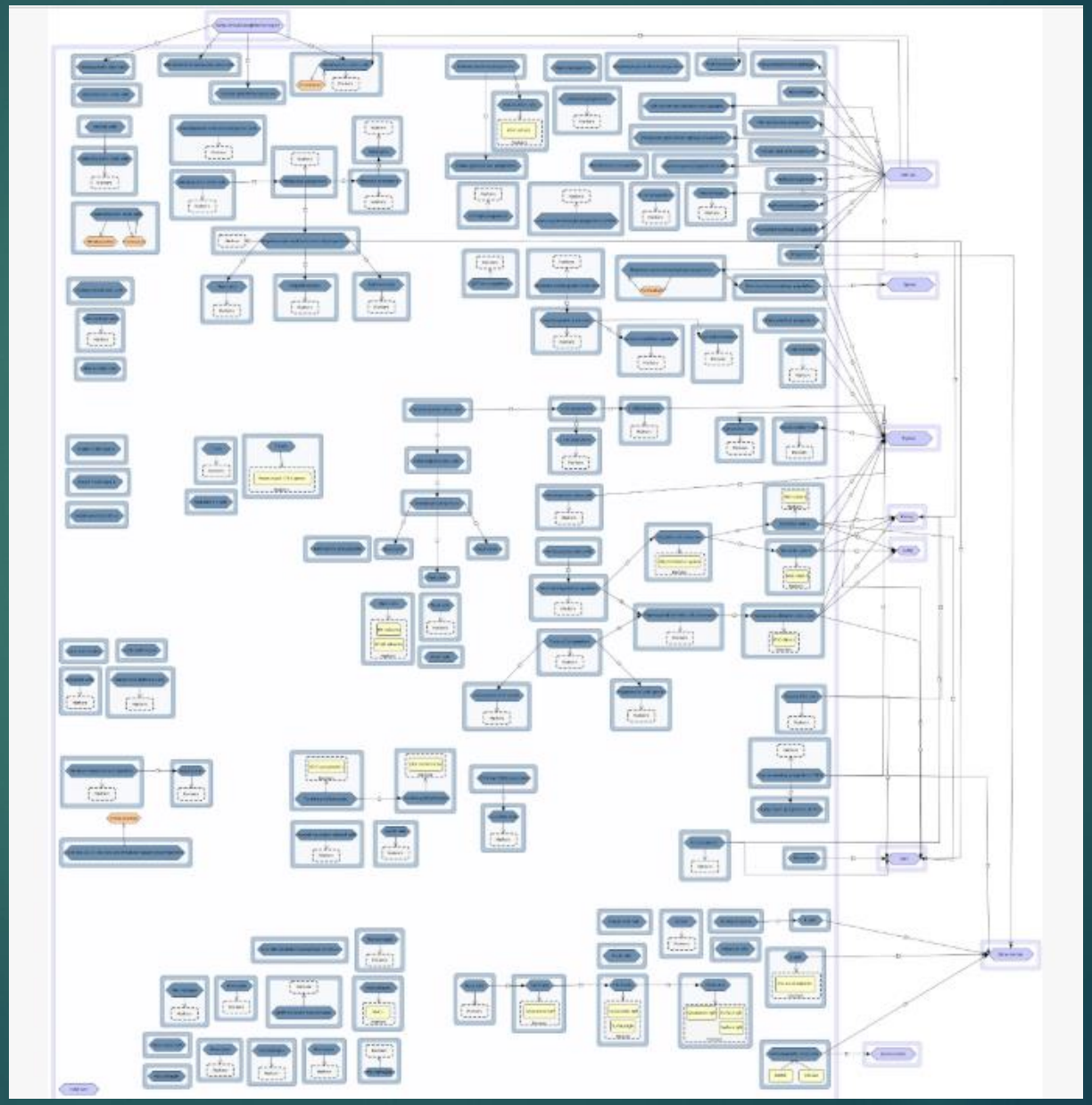
(B) Migracijska pokrajina, ki prikazuje razmerje med izhodnimi in vhodnimi migracijskimi dogodki za vsak organ.

(C) Polarnost neto migracije med organi, izračunana kot razlika med izhodnimi in vhodnimi dogodki (Izhodni - Vhodni).



Ta organsko specifičen podzemljevid HIDmap-a predstavlja prostorsko in funkcionalno organizacijo fetalnih jeter.

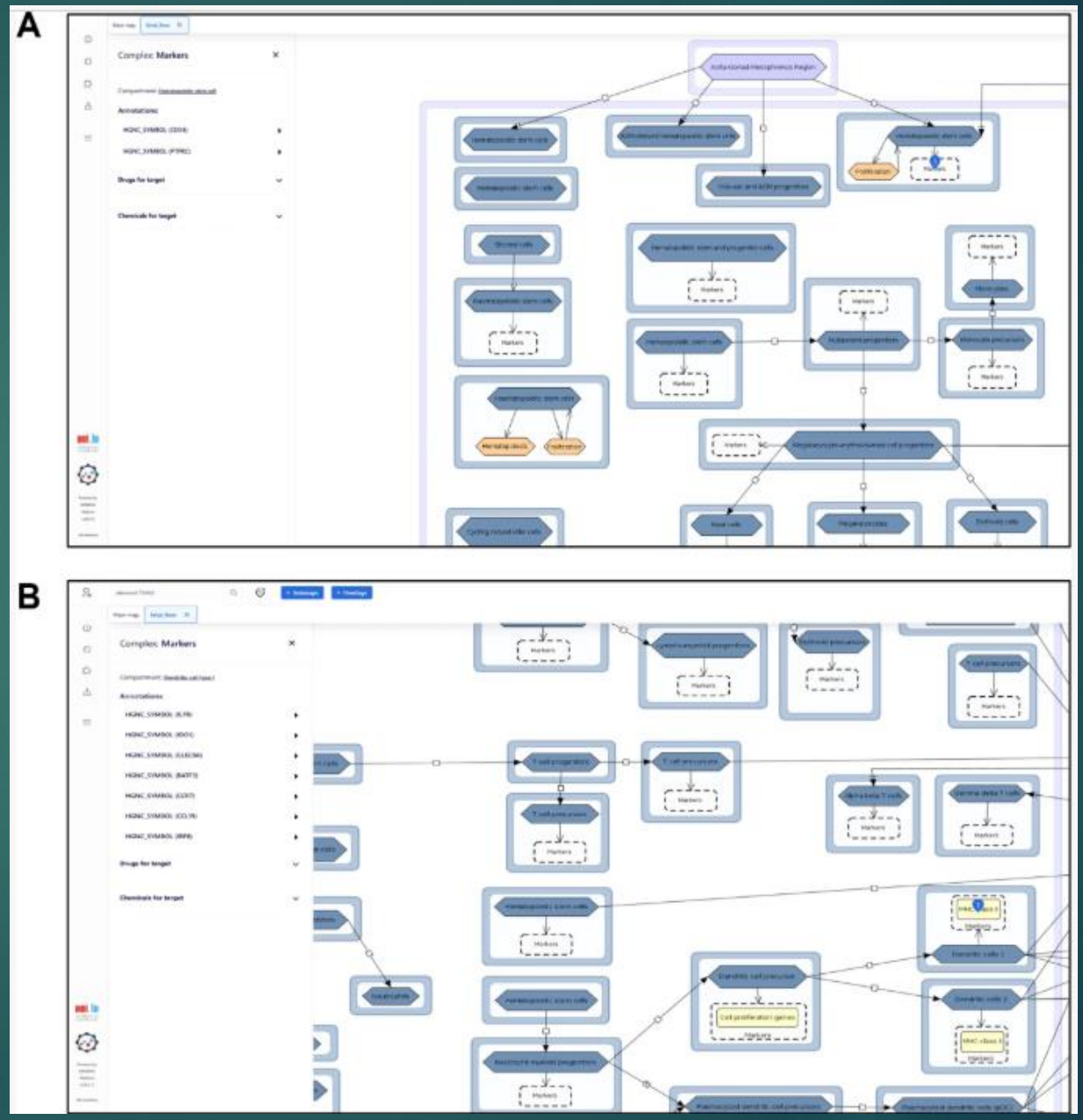
Celotno interaktivno različico zemljevida si lahko ogledate na https://immunedev.elixir-luxembourg.org/minerva/.



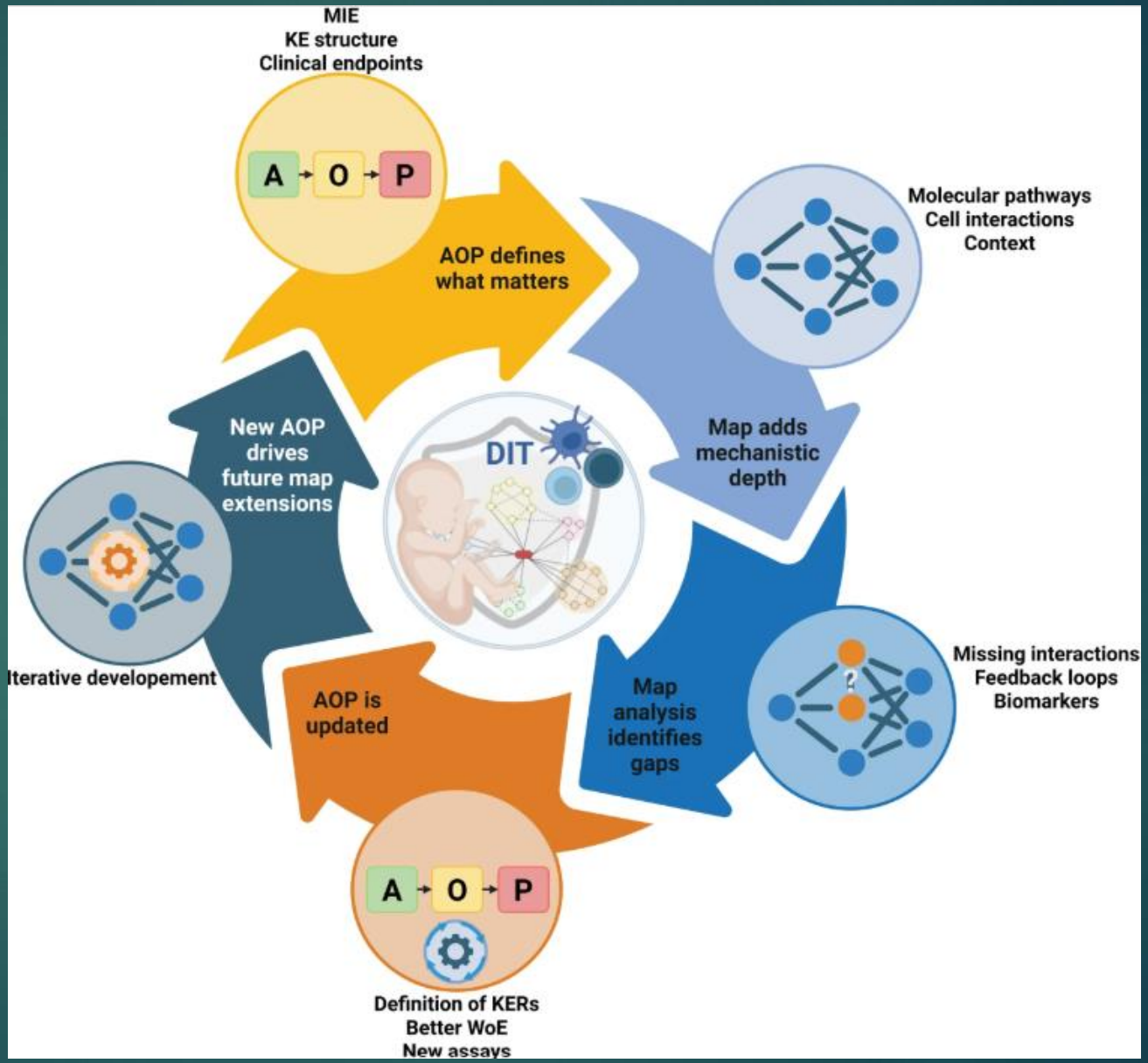
Vizualizacija izražanja markerjev različnih imunskih celic na platformi MINERVA.

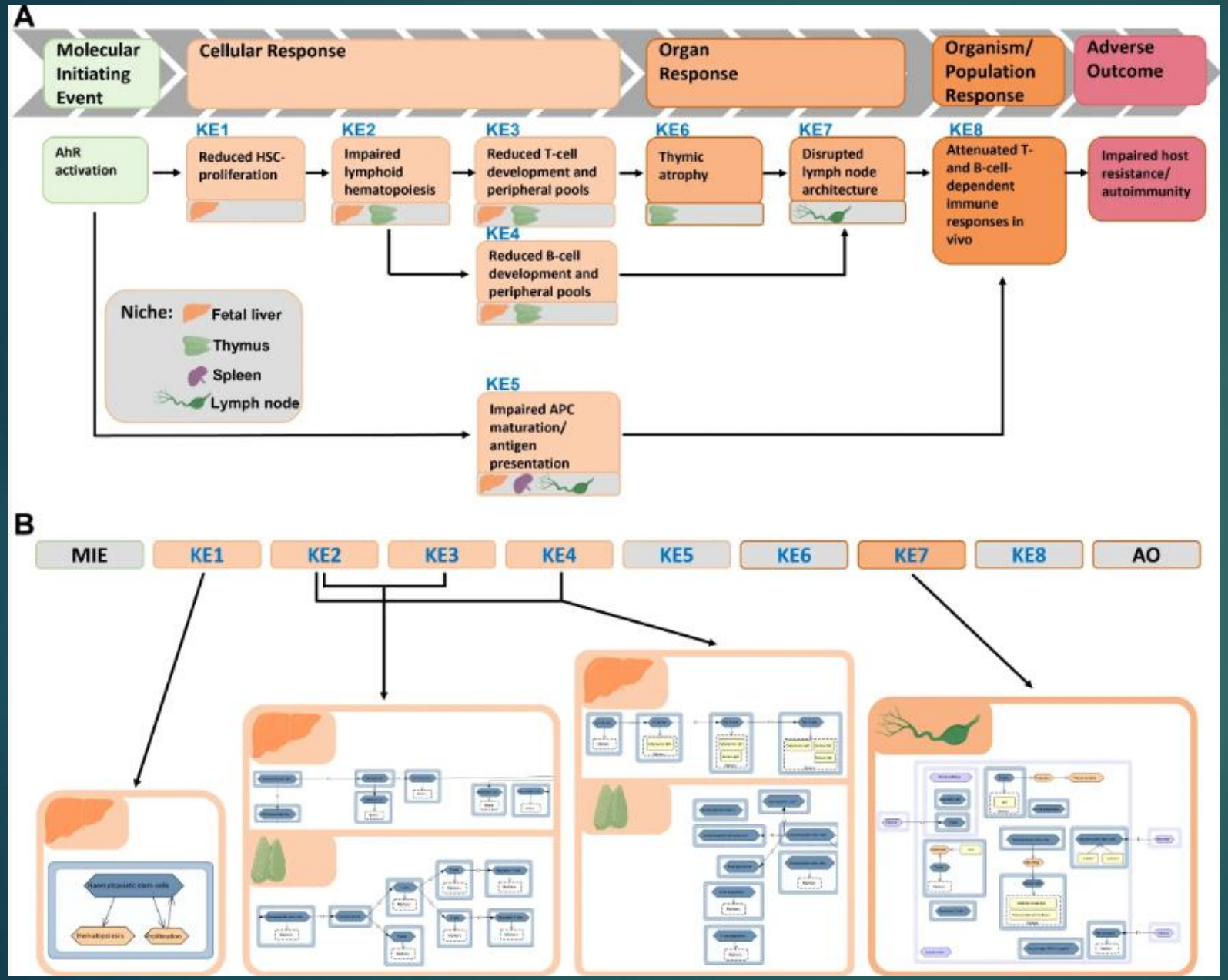
(A) Primer markerjev hematopoetskih matičnih celic.
(B) Izjeme pri oznakah markerjev

Celotno interaktivno različico zemljevida si lahko ogledate na https://immunedev.elixir-luxembourg.org/minerva/.



Konceptualni okvir za interativno in dvosmerno integracijo Zemljevida razvoja človeškega imunskega sistema (HIDmap) in poti neželenih izidov (AOP).






Prikazan je domnevni AOP, ki povezuje aktivacijo AhR z imunosupresijo zaradi motenega limfatičnega razvoja in delovanja.

Prikazane primere je mogoče najti v iskalnem polju HIDmap z vnosom naslednjih edinstvenih številk elementov:

element:81052 (KE1); element:81139 (fetalna jetra), element:81780 (timus) (KE2 + 3); element:81202 (fetalna jetra), element:81852 (timus) (KE2 + 4); element:81932 (KE7).

# Omejitve in prihodnje smeri razvoja HIDmap-a

Trenutna različica HIDmapa se osredotoča na razvoj prenatalnega imunskega sistema in temelji na literaturi, objavljeni med letoma 2017 in 2022.

Prihodnje posodobitve bodo vključevale

- ✓ novo dostopne nabore podatkov s skupnimi prizadevanji v okviru projekta PARC
- ✓ razširjene nabore podatkov in izboljšanje vira, ki ga bo vodila skupnost.
- ✓ Kar zadeva razvoj AOP, HIDmap zajema predvsem celične procese in molekularne interakcije, dogodki višje ravni na ravni organov ali organizmov so predstavljeni le v omejenem obsegu in se bodo dopolnjevali z novimi podatki.

HVALA za pozornost



natasa.petrovic@nijz.si