

**Umweltforschungsplan
des Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz und Reaktorsicherheit**

IV 1.1 – Internationales Chemikalienmanagement

FKZ 3708 65 400

**Der Fischembryotest als Alternativmethode für den akuten
Fischttest – abschließend notwendige Laboruntersuchungen
und Datenanalysen zur Validierung des Fischembryotests für
das OECD Prüfrichtlinienprogramm**

von

Prof. Dr. Thomas Braunbeck,

Svenja Böhler, Ruben Strecker, Frauke Fedderwitz, Dr. Kirsten Henn,
Britta Kais, Dr. Eva Lammer, Katharina Schneider und Dr. Stefan Weigt

Aquatische Ökologie und Toxikologie

Center for Organismal Studies
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 230
69120 Heidelberg

IM AUFTRAG
DES UMWELTBUNDESAMTES

März 2012

Berichtskennblatt

Berichtsnummer	UBA-FB 00
Titel des Berichts	Der Fischembryotest als Alternativmethode für den akuten Fischtest - abschließend notwendige Laboruntersuchungen und Datenanalysen zur Validierung des Fischembryotests für das OECD Prüfrichtlinienprogramm
Autor(en) (Name, Vorname)	Braunbeck, T., Böhler, S., Strecker, R., Fedderwitz, F., Henn, K., Kais, B., Lammer, E., Weigt, S.
Durchführende Institution (Name, Anschrift)	Aquatische Ökologie und Toxikologie Centre for Organismal Studies Universität Heidelberg Im Neuenheimer Feld 230 D-69120 Heidelberg
Fördernde Institution	Umweltbundesamt Postfach 14 06 06813 Dessau-Roßlau
Abschlussdatum	30.03.2012
Forschungskennzahl (FKZ)	3708 65 400
Seitenzahl des Berichts	52 (ohne Anhänge)
Zusätzliche Angaben	
Schlagwörter	Fischembryo; Fischembryotest; FET; Fischtest; OECD TG 203; Zebraabärbling, Medaka; Dickkopfelnritze; Validierung; Chorion; Dechorionierung; Biotransformation; Cytochrom P450

Report Cover Sheet

Report No.	UBA-FB 00
Report Title	The Fish Embryo Test as an alternative method for the acute fish test -- final laboratory studies and data analyses for the validation of the Fish Embryo Test for the OECD Test Guidelines Program
Author(s) (Family Name, First Name)	Braunbeck, T., Böhler, S., Strecker, R., Fedderwitz, F., Henn, K., Kais, B., Lammer, E., Weigt, S.
Performing Organisation (Name, Address)	Aquatische Ökologie und Toxikologie Centre for Organismal Studies Universität Heidelberg Im Neuenheimer Feld 230 D-69120 Heidelberg
Funding Agency	Umweltbundesamt Postfach 14 06 06813 Dessau-Roßlau
Report Date	March 30th, 2012
Project No. (FKZ)	3708 65 400
No. of Pages	52 (w/o Annexes)
Supplementary Notes	
Keywords	fish embryo; fish embryo test; FET; fish test; OECD TG 203; zebrafish; medaka; fathead minnow; validation; chorion; dechorionation; bio-transformation; cytochrome P450

Zusammenfassung

Ziel des Projekts mit dem Titel „Der Fischembryotest als Alternativmethode für den akuten Fischttest – abschließend notwendige Laboruntersuchungen und Datenanalysen zur Validierung des Fischembryotests für das OECD Prüfrichtlinienprogramm“ (FKZ 3708 65 400) war es, die Validierung des Fischembryotoxizitätstest als Alternativmethode zum akuten Fischttest (OECD 203) in der regulativen Stoffprüfung durch kontinuierliche Beteiligung Deutschlands am laufenden OECD-Projekt abzuschließen. Deutschland leitet im OECD-Prüfrichtlinienprogramm das OECD-Projekt und trägt zusammen mit dem OECD-Sekretariat die Verantwortung für den erfolgreichen Abschluss. Das Projekt beinhaltete vor allem die noch anstehenden experimentellen Arbeiten und fachlichen Beiträge der Phase 1 und Phase 2 der formalen Validierung von deutscher Seite.

Seit 1. Juni 2006 ist die REACH-Verordnung in Kraft, so dass befürchtet wird, dass in den kommenden Jahren die Zahl der Tierversuche stark ansteigen wird. Daher bemühen sich alle Beteiligten (Industrie, Behörden, Wissenschaft, Tierschutzverbände), Alternativmethoden abschließend und erfolgreich zu validieren. Im Bereich Umwelt kann die erfolgreiche Validierung des Fischembryotests auf OECD-Ebene einen Betrag leisten, Tierversuche in beträchtlichem Umfang zu vermeiden. Daher war es das erklärte Ziel, den Prüfrichtlinienentwurf zum Fischembryotest auf dem 22. Treffen der Nationalen Koordinatoren für das OECD-Prüfrichtlinienprogramm im April 2010 zu verabschieden. Verabschiedete OECD-Prüfmethoden unterliegen der gegenseitigen Anerkennung von Daten in den OECD Staaten (MAD – Mutual Acceptance of Data). Validierte Alternativmethoden sind nach § 13 Absatz 1 der REACH-Verordnung bevorzugt anzuwenden.

Maßgebliche Grundlage für das UBA-Projekt waren die Arbeitspläne, die von den verantwortlichen OECD-Gremien, d.h. der OECD ad hoc Expert Group zum Fischembryotest (FET) und der Validation Management Group zum FET erarbeitet und verabschiedet wurden. Aus verschiedenen Gründen verzögerte sich allerdings die Validierung des FET so stark, dass das Projekt mehrmals kostenneutral verlängert werden musste. Die Phase II der Validierung kam erst mit Ende des Jahres 2011 zum Abschluss, so dass der abschließende Validierungsbericht erst im Frühjahr 2012 der Arbeitsgruppe der Nationalen Koordinatoren des OECD-Prüfrichtlinienprogramms (WNT) vorgelegt werden konnte. Mit einigen redaktionellen Anmerkungen wurde der Bericht abgesegnet und einem weiteren externen Begutachtungsverfahren zugeleitet, das nach einer letzten Aktualisierung der Draft Test Guideline im Sommer und Herbst des Jahres 2012 erstellt werden soll. Die Endversion des Prüfrichtlinienentwurfs soll dann im Frühjahr 2013 der WNT zur Verabschiedung vorgelegt werden.

Die Leistungen innerhalb des Projekts beinhalteten vor allem alle Vorbereitungen, die von deutscher Seite zur Sicherung eines erfolgreichen Starts der 2-teiligen Validierung zu leisten sind, sowie die Teilnahme an beiden Phasen der OECD-Validierung des Fischembryotest. Die endgültige Festlegung der Details zum Verfahren der OECD-Validierung erfolgte in enger Abstimmung mit den verantwortlichen OECD-Gremien. Die AG Aquatische Ökologie und Toxikologie am Centre for Organismal Studies (COS) der Universität Heidelberg hatte von Anfang an die Funktion des Technical Lead Laboratory inne, d.h., es übernahm die Verantwortung für die Lösung aller technischen Probleme, die z.B. während der Entwicklung und des Transfers der Standard Operation Procedure (SOP; im Grunde identisch mit der Draft Test Guideline) auf neue an der Validierung teilnehmenden Laboratorien auftraten. Auch die Erstellung der Urfassung der SOP war Aufgabe des Heidelberger Labors.

Um die Validierung zu beschleunigen, erklärte sich das Heidelberger Labor auch bereit, zusammen mit Procter & Gamble (Cincinnati, USA) alle Range Finding-Tests in Phase 1A und B zu übernehmen. Für alle 13 Substanzen der Validierungsphase 2 übernahm das Heidelberger Labor kostenneutral das gesamte Range Finding.

Daneben ergab sich aus den Diskussionen um den FET immer wieder die Notwendigkeit, wissenschaftlich fundierte Grundlagen zu schaffen, um grundsätzliche Fragen bezüglich des FET zu klären. Im Detail wurden im Rahmen des Projekts folgende Fragen untersucht:

- (1) Arbeiten im Rahmen der OECD-Validierung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch
- (2) Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf von Embryonen des Zebrafisch
- (3) Untersuchungen zur Toxizität von hoch konzentrierten Salzlösungen auf Embryonen des Zebrafisch
- (4) Ab wann ist ein Versuch mit Fischembryonen ein Tierversuch gemäß der neuen EU Richtlinie 2010/63?
- (5) Untersuchungen zur Barrierefunktion des Chorions des Zebrafisch I: Morphologie und Ultrastruktur des Chorions
- (6) Untersuchungen zur Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebrafisch II: Die Verteilung von ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen in Ei und Embryo des Zebrafisch
- (7) Die Dechorionierung von Eiern des Zebrafisch: ein Werkzeug zur Verbesserung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch?
- (8) Ergänzende Untersuchungen zur Permeabilität des Chorions des Zebrafisch
- (9) Der Fischembryotest im Durchfluss – die Lösung aller Probleme?
- (10) Die Korrelation zwischen dem Fischembryotest und dem konventionellen Fischtest
- (11) Entwicklung von Protokollen zu Fischembryotests mit Dickschlammfritze und Medaka
- (12) Untersuchungen zur Biotransformationskapazität von Embryonen des Zebrafisch

Alle Untersuchungen konnten erfolgreich abgeschlossen werden, womit eine ganze Reihe von Bedenken gegen den Fischembryotest als Alternativmethoden zum akuten Fischtest ausgeräumt werden konnten. Die Untersuchungen zur Barrierefunktion des Chorions und zur Biotransformationskapazität von Embryonen des Zebrafisch werden im Rahmen weiterer Projekte fortgeführt werden.

1. Arbeiten im Rahmen der OECD-Validierung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch

Die Arbeiten zur Validierung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch im Rahmen des OECD-Protokolls begannen im Frühjahr 2009. Das Heidelberger Labor übernahm zunächst (unter finanzieller Unterstützung durch das UBA und das MWK des Landes Baden-Württemberg) zunächst die Aufgabe, die Standard Operation Procedure (SOP) für den eigentlichen Fischembryotest zu entwerfen und in Zusammenarbeit mit den anderen beteiligten Labors permanent zu optimieren. Die externe Koordination der OECD-Validierung wurde Dr. Marlies Halder, ECVAM (Ispra, Italien) übertragen. Alle Entscheidungen werden im Rahmen von Telefonkonferenzen einer Validation Management Group getro-

fen. Die begleitende statistische Auswertung wurde zunächst von Dr. André Kleensang (ECVAM) und später von Dr. Greg Carr (Procter & Gamble; Cincinnati, USA) übernommen. Das Heidelberger Labor übernahm die Aufgabe des Technical Lead Laboratory und war damit für die Lösung technischer Probleme in den teilnehmenden Labors zuständig. In Phase 1 nahmen an der Validierung insgesamt 7 Labors, in Phase II insgesamt 8 Labors teil.

Im Rahmen der Arbeiten zur OECD-Validierung des Fischembryotests übernahm das Heidelberger Labor die Entwicklung der Standard Operation Procedure (SOP) sowie die Aufgaben des Technical Lead Laboratory. In Phase 1 der OECD-Validierung konnte anhand von insgesamt 7 Substanzen mit unterschiedlicher Toxizität und verschiedenen Wirkungsmodi erfolgreich die Reproduzierbarkeit des Fischembryotests sowohl innerhalb eines Labors als auch zwischen 5 verschiedenen Laboratorien dokumentiert werden. In der derzeit laufenden Phase 2 der OECD-Validierung des Fischembryotests werden 13 weitere Substanzen geprüft. Als einziges Labor testete das Heidelberger Labor in Phase 2 alle 13 Testsubstanzen.

Die Phase II der Validierung kam erst mit Ende des Jahres 2011 zum Abschluss, so dass der abschließende Validierungsbericht erst im Frühjahr 2012 der Arbeitsgruppe der Nationalen Koordinatoren des OECD-Prüfrichtlinienprogramms (WNT) vorgelegt werden konnte. Mit einigen redaktionellen Anmerkungen wurde der Bericht abgesegnet und einem weiteren externen Begutachtungsverfahren zugeleitet, das nach einer letzten Aktualisierung der Draft Test Guideline im Sommer und Herbst des Jahres 2012 erstellt werden soll. Die Endversion des Prüfrichtlinienentwurfs soll dann im Frühjahr 2013 der WNT zur Verabschiedung vorgelegt werden.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht in folgenden Anhängen nachzulesen:

Anhang 1 *Standard Operation Procedure (SOP) Fish Embryo Test.*

Anhang 2 *Report OECD-Validierung Fischembryotest Phase 1.*

Anhang 3 *Bericht zur Statistik zum Draft Report OECD-Validierung Fischembryotest.*

Anhang 4 *Draft Report OECD-Validierung Fischembryotest Phase 2*

2. Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf von Embryonen des Zebrabärblings

Im Rahmen einer Diplomarbeit (Anhang 1) wurde mit Hilfe von Mikrosonden untersucht, ob niedrige Sauerstoffkonzentrationen, wie sie bei der Prüfung von Abwässern und Sedimenten auftreten können, zu einem vorzeitigen, nicht stoffbezogenen Tod von Embryonen des Zebrabärblings führen können. Die Messungen ergaben, dass an der Oberfläche von organisch stark belasteten Sedimenten tatsächlich starke Sauerstoffgradienten auftreten können. Der Sauerstoffbedarf eines Embryos des Zebrabärblings ist jedoch so gering, dass eine Schädigung des Embryos im Fischembryotest nur in extremen Ausnahmefällen eintreten wird. Erst Sauerstoffwerte unterhalb von 0,88 mg/L waren 100 % letal. Embryonen, die Sauerstoffkonzentrationen ≤ 0.3 mg/L exponiert waren, koagulierten innerhalb von 24 bis 48 h. Eine weitere Behandlung der getesteten Embryonen unter normoxischen Bedingungen (96 h Belastung + 96 h Normoxie) zeigte, dass sich alle Embryonen bis zu einer Sauerstoffkonzentration von 1,47 mg/L erholen konnten. Der gesamte Sauerstoffverbrauch (unter Normalbedingungen) der Embryonen beträgt 0,674 μmol in den ersten 72 h nach der Befruchtung. Der Verbrauch steigt vom ersten zum zweiten Tag von 0,165 auf 0,244 μmol an und erreicht am dritten Tag den höchsten Wert mit 0,265

µmol. Eine Schädigung der Embryonen durch mangelhafte Sauerstoffversorgung bei der Prüfung von Abwässern und Sedimenten kann also erst bei sehr geringen Sauerstoffspannungen auftreten.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht in folgenden Anhängen nachzulesen:

Anhang 5 *Ruben Strecker 2008 Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf des Zebraärbblings (*Danio rerio*) im Sedimentkontakttest. Diplomarbeit Universität Heidelberg.*

Anhang 6 *Strecker, R., Seiler, T.B., Hollert, H., Braunbeck, T. (2011) Oxygen requirements of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. Comp. Biochem. Physiol. 153 C: 318-327.*

3. Untersuchungen zur Toxizität von hoch konzentrierten Salzlösungen auf Embryonen des Zebraärbblings

Im Rahmen der Dissertation von Kirsten Henn wurde unter anderem Kaliumchlorid (KCl) als ein bekannter Ausreißer (d.h., es treten signifikante Unterschiede in der Toxizität gegenüber Embryonen und Adulten des Zebraärbblings auf) im Vergleich zu anderen Salzen (K_2SO_4 , $KHCO_3$, NaCl, Na_2SO_4 , and $NaHCO_3$) im standardisierten sowie verlängerten Fischembryotest untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass KCl nur im 48 h-Standard-Fischembryotest aus dem Rahmen fällt; für alle anderen untersuchten Salze stimmen die Befunde aus dem Fischembryotest mit jenem aus dem konventionellen Fischtest sehr gut überein. Eine Verlängerung der Expositionszeit führt auch für KCl zu einer ähnlichen Toxizität wie im Experiment mit adulten Zebraärbblings. Als Erklärung für die vorübergehenden Abweichungen im FET wird eine unterschiedliche Regulation bzw. eine unterschiedliche Lokalisation der Ionen-Transporter beim Embryo und beim adultem Fisch diskutiert. Da der FET am Ende aber sicher über einen Zeitraum von mindestens 96 h laufen wird, spielt das Problem der (vorübergehend) geringen Toxizität von Hochsalzlösungen nicht ins Gewicht.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht im folgenden Anhang nachzulesen:

Anhang 7 *Wendler, K., Strecker, R., Braunbeck, T. (2011) Toxicity of anionic salts in the fish embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*). Manuscript submitted to Comp. Biochem. Physiol.*

4. Ab wann ist ein Versuch mit Fischembryonen ein Tierversuch?

Weltweit wurde der Zebraärbbling mittlerweile ein wichtiges Modell in der biomedizinischen Forschung und in der (Öko-)Toxikologie. Insbesondere der Embryo des Zebraärbblings erfährt zunehmende Beachtung, da er in der Regel als Ersatzmethode zum Tierexperiment mit intakten (adulten) Zebraärbblings angesehen wird. Insbesondere komplexere Endpunkte erfordern jedoch die Exposition bis ins Stadium der geschlüpften Eleutheroembryonen ohne externe Nahrungsaufnahme. Nach der neuen EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz von Tieren im Einsatz für wissenschaftliche Experimente wird nun für den Geltungsbereich der europäischen Union einheitlich festgelegt, dass frühe, nicht „freilebende“ Entwicklungsstadien von Tieren als nicht geschützt eingestuft werden. Als solche Entwicklungsstadien von Fischen werden im Sinne der Richtlinie alle Stadien aufgefasst, die sich nicht unabhängig ernähren. Damit sind Eleutheroembryonen, also geschlüpfte, jedoch noch nicht aktiv extern fressende Embryonen des Zebraärbblings als nicht geschützte Stadien auszufassen. Da trotz dieser eigentlich klaren Definition immer noch unterschiedliche Auffassungen in der Interpretation dieses Kriteriums der Nahrungsaufnahme existieren, wurde ein Positionspapier verfasst, in dem eine wissen-

schaftlich fundierte Begründung für die Definition des Zeitpunkts der externen Nahrungsaufnahme gesucht wird. Die Analyse ergibt, dass auf der Basis von Dotternutzung, aktiver Nahrungsaufnahme und Schwimmverhalten erst ab 120 Stunden nach Befruchtung von einer aktiven externen Nahrungsaufnahme und -nutzung ausgegangen werden kann. Experimente mit dem Zebrafärbliug fallen daher bis zu einem Alter von 120 Stunden (5 Tagen) nicht unter die Bestimmungen der europäisohen Tiersehutzrichtlinie und sollten daher bis zu diesem Alter nicht als Tierversuche eingestuft werden.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht im folgenden Anhang nachzulesen:

Anhang 8 *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. Reprod. Toxicol. 33:245-253.*

5. Untersuchungen zur Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebrafärbliugs I: Morphologie und Ultrastruktur des Chorions

Das Chorion von Fischen kann potentiell als Barriere die Aufnahme von chemischen Substanzen in den Embryo behindern. Um die morphologischen Grundlagen für eine solche Barrierefunktion zu klären, wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Frauke Fedderwitz die Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebrafärbliugs im Detail beschrieben. Sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch erwies sich das Chorion als dreischichtige Struktur, die von zahlreichen Poren durchzogen ist. In späteren Entwicklungsstadien sind die Poren verschlossen; sie dienen vermutlich der Versorgung des Eis mit Dotter. Ultrastrukturell konnte nachgewiesen werden, dass die Poren in bestimmten Entwicklungsstadien von Mikrovilli der Follikelzellen durchzogen werden. Die Anzahl der Poren sowie ihr Durchmesser verändern sich mit dem Reifezustand der Eier nicht. Vermutlich unter dem Einfluss von Schlupfenzymen verändert sich die äußere Oberfläche der Eier im Laufe der Eireifung.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht im folgenden Anhang nachzulesen:

Anhang 9 *Frauke Fedderwitz 2008 Morphologie und Ultrastruktur des Chorions vom Zebrafärbliug (Danio rerio). Bachelorarbeit, Universität Heidelberg.*

6. Untersuchungen zur Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebrafärbliugs II: Die Verteilung von ausgewählten Fluoreszenz-farbstoffen in Ei und Embryo des Zebrafärbliugs

Um die Barrierefunktion des Chorions zu untersuchen, wurden Eier des Zebrafärbliugs in fluoreszenzmarkierten Farbstoffen inkubiert, um den Transfer der Substanzen über das Chorion im Fluoreszenz- oder Laserscanning-Rastermikroskop zu verfolgen. Gut wasserlösliche Substanzen wie Rhodamin b und Sulforhodamin b akkumulieren im Dotter des Zebrafärbliugs; allerdings diffundiert Sulforhodamin b mit seinen geladenen Substituenten erst nach 48 Stunden durch das sich verändernde Chorion. Das kleinste Molekül Fluorescein sammelt sich bereits nach 24 Stunden vermehrt im Blut und Gehirn, während 2,7-Dichlorofluorescein und 5-Carboxy-2,7-dichlorofluorescein das Chorion erst nach 48 Stunden passieren konnten. Fluorescein-markiertes Dextran mit 3 kDa kann das Chorion nicht passieren und sammelt sich in den Poren. Die Aufnahme von Fluorescein über das Chorion wird durch DMSO-Konzentrationen von 1 und 0,1 % gesteigert, während Fluorescein in 0,01 % DMSO das Chorion nicht passieren kann.

Die Studie zeigt, dass die Barrierefunktion des Chorions einerseits durch die Polarität, die Komplexität, aber auch durch den Octanol-Wasser-Koeffizienten, also die Lipophilie der Substanzen beeinflusst wird. Außerdem wird gezeigt, dass höhere DMSO Konzentrationen die Permeabilität des Chorions herabsetzt und dadurch eventuell ein neuer Ansatz zur Erforschung der Bedeutung des Chorions in Bezug auf die Embryotoxizität gegeben wird.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht im folgenden Anhang nachzulesen:

Anhang 10 *Britta Kais 2009 The distribution of different fluorescence dyes in the egg and embryo of the zebrafish (Danio rerio). Diplomarbeit, Universität Heidelberg.*

7. Die Dechorionierung von Eiern des Zebraärbhlings: ein Werkzeug zur Verbesserung des Fischembryotests mit dem Zebraärbhling?

Im Rahmen der Dissertation von Kirsten Henn wurde ein Protokoll zur Dechorionierung von Embryonen des Zebraärbhlings entwickelt. Eine erfolgreiche Dechorionierung des Zebraärbhlings mit Überlebensraten > 90 % erwies sich erst ab einem Alter von 24 h nach Befruchtung sinnvoll; bei früheren Entwicklungszeitpunkten sinken die Überlebensraten auf 60 - 80 %. Als Beispielsubstanz für die Dechorionierung des Zebraärbhlings wurde Luviquat HM 552 gewählt, da diese Substanz aufgrund ihres Molekulargewichts von ca. 40.000 D das Chorion nicht passieren kann. Luviquat HM 552 wirkt auf dechorionierte Embryonen jedoch genauso toxisch wie auf frisch geschlüpfte Embryonen sowie Eleutheroembryonen, die erst nach dem Schlupf exponiert wurden. Die Dechorionierung stellt eine Methode dar, um in kritischen Fällen eine sichere Entscheidung zu treffen, ob eine Substanz auf Embryonen toxisch ist, so dass falsch negative Befunde ausgeschlossen werden können.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht im folgenden Anhang nachzulesen:

Anhang 11 *Henn, K., Braunbeck, T. 2010 Dechorionation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. 153C: 91-98.*

8. Ergänzende Untersuchungen zur Permeabilität des Chorions des Zebraärbhlings

Im November 2011 konnten mit einer Aufstockung der Mittel im Rahmen des hier beschriebenen UBA-Projekts weitere Untersuchungen zur Permeabilität des Chorions des Zebraärbhlings initiiert werden, die wie folgt zusammengefasst werden können:

- (1) Gut wasserlösliche, aber nicht dissoziierte Substanzen werden in der Regel problemlos über das Chorion des Zebraärbhlings und in den Embryo aufgenommen.
- (2) Substanzen mit geladenen Seitengruppen und einem Molekulargewicht unter 3000 Dalton diffundieren erst nach Erreichen eines Alters von 48 h.
- (3) Substanzen mit einem Molekulargewicht von > 3000 Dalton passieren das Chorion des Zebraärbhlings nicht.
- (4) Die Molekülkonfiguration der Substanz beeinflusst die Aufnahme der Substanz über das Chorion des Zebraärbhlings.
- (5) DMSO-Konzentrationen > 0,1 % reduzieren die Barrierefunktion des Chorions des Zebraärbhlings, sofern diese überhaupt existiert.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht im folgenden Anhang nachzulesen:

Anhang 12 *Kais, B., Keiter, S., Schneider, K.E., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T. (2012) DMSO modifies the permeability of the zebrafish (Danio rerio) chorion – implications for the fish embryo test (FET). Comp. Biochem. Physiol. eingereicht.*

9. Der Fischembryotest im Durchfluss – die Lösung aller Probleme?

Abweichungen von Befunden im Fischembryotest von jenen im konventionellen Fischtest können auch dadurch zustande kommen, dass die Testsubstanzen z.B. so stark an das Plastikmaterial der 24-Well-Platten adsorbiert, dass sie nicht mehr verfügbar sind, also gar nicht in den Embryonen ankommen. Dieser Problematik wird im konventionellen Fischtest durch eine Exposition im permanenten Durchfluss begegnet. Da eine Durchflussvariante für 24-Well-Platten kommerziell nicht erhältlich ist, wurden in der Dissertation von Eva Lammer unter anderem 24-Well-Platten individuell so umgebaut, dass sie im Durchfluss betrieben werden konnten.

Während durch den Durchfluss für eine Reihe von Substanzen, die vorher als Ausreißer galten (z.B. Endosulfan), eine deutliche Annäherung der Fischembryotestbefunde erreicht werden konnte, konnte für andere Substanzen nachgewiesen werden, dass die Abweichungen nicht auf Adsorptionsphänomene zurückzuführen sind (Bsp.: 4-Chlorphenol).

Durch eine Exposition im Durchfluss lässt sich also für manche, jedoch nicht alle Substanzen eine Annäherung an die Toxizität im konventionellen Fischtest erzielen. Selbstverständlich fallen bei einem Betrieb im Durchfluss größere Substanzmengen an, was eine chemische-analytische Bestätigung der realen Substanzkonzentrationen wesentlich erleichtern kann. Vor allem aber eignet sich die Durchflussvariante des Fischembryotests, wenn eine längerfristige Exposition – z.B. im Sinne einer Erweiterung auf einen Teratogenitätstest – angestrebt wird.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht im folgenden Anhang nachzulesen:

Anhang 13 *Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendler, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio). Toxicol. In Vitro 23: 1436-1442.*

10. Die Korrelation zwischen dem Fischembryotest und dem konventionellen Fischtest

Um die Eignung des Fischembryotests auch für die Chemikalienprüfung zu prüfen, wurde eine umfangreiche Analyse der Korrelation zwischen Befunden aus dem Fischembryotest und Befunden aus dem konventionellen Fischtest erstellt. Insgesamt wurden Toxizitätsuntersuchungen zu 143 Substanzen erfasst und statistische Verfahren entwickelt, um sowohl die Variabilität der Daten innerhalb von Fischembryotests als auch innerhalb von Fischtests ebenso zu prüfen wie die eigentliche Korrelation zwischen klassischem Test und Alternativmethode. Die Befunde dokumentieren generell eine sehr gute Korrelation zwischen Fischembryotest und Fischtest. Die Variabilität von Toxizitätsdaten, die an verschiedenen Fischarten erhoben wurden, ist genauso groß wie oder größer als die Abweichungen zwischen Fisch- und Fischembryotest. Auch die Korrelation zwischen Embryonen und Eleutheroembryonen ist ausgezeichnet. Die Zahl an Ausreißern ist sehr klein, so dass das Risiko falsch positiver oder falsch negativer Befunde gering ist.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht im folgenden Anhang nachzulesen:

- Anhang 14 Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T. (2009) *Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. 149C: 196-209.*

11. Entwicklung von Protokollen zu Fischembryotests mit Dickkopfelritze und Medaka

Obwohl ursprünglich im Antrag zu diesem Gesamtprojekt vorgesehen, wurde zunächst keine weitere Optimierung der Protokolle für Fischeitests mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) und dem Medaka (*Oryzias latipes*) vorgenommen, da die OECD Ad hoc-Expertengruppe beschlossen hatte, den Fischembryotest zunächst nur mit dem Zebrafisch weiterzuverfolgen. Es lag jedoch aus früheren Arbeiten der Heidelberger Arbeitsgruppe ein Vorschlag für die Adaption der Verfahrensweise mit dem Zebrafisch an die beiden anderen OECD-Fischarten vor. Nach vorläufigen Daten ergeben diese Anpassungen eine gute Korrelation der Befunde aus Fischembryotests mit der Dickkopfelritze und dem Medaka mit Toxizitätsdaten aus Fischembryotests mit dem Zebrafisch. Da sich jedoch seit 2010 abzeichnete, dass die Akzeptanz des Fischembryotests in den USA deutlich verbessert werden kann, wenn eine zum Standardverfahren mit dem Zebrafisch analoge Verfahrensvorschrift für einen Fischembryotest mit der Dickkopfelritze vorliegt, wurde mit einer 2012 fertiggestellten Diplomarbeit die Weiterentwicklung des 2005 entwickelten Protokolls in Angriff genommen.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht in folgenden Anhängen nachzulesen:

- Anhang 15 Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, R., Seitz, N. (2005) *Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species B an update. ALTEX 22: 87-102.*
- Anhang 16 Böhler, S. (2012) *The fathead minnow embryo as a model for the development of alternative testing methods in ecotoxicology. Diplomarbeit, Universität Heidelberg.*

12. Untersuchungen zur Biotransformationskapazität in Embryonen des Zebrafisches (*Danio rerio*)

Fische sind wie alle Organismen prinzipiell in der Lage, die meisten Fremdstoffe, die in sie eindringen, zu verstoffwechseln (Biotransformation), wobei es in der Regel zu einer Entgiftung kommt. Da die meisten Biotransformationsreaktionen jedoch auf Reaktionsmechanismen zurückgreifen, die in der Evolution zunächst für physiologische Substrate im normalen Stoffwechsel optimiert worden waren (also die Fremdstoffe sozusagen „zufällig“ passen), ist nicht garantiert, dass die Metaboliten, die aus den Biotransformationsreaktionen hervorgehen, weniger toxisch sind; vielmehr kann es auch zu einer „Giftung“ (Bioaktivierung) kommen. Alternativen zum aktiven Fischtest wie der Fischembryotest sollten daher ebenfalls über Bioaktivierungskapazitäten verfügen, da sie sonst nicht in der Lage wären, Fremdstoffe in ihrer Wirkung anzuzeigen, die einer Aktivierung durch Biotransformation bedürfen.

Ein häufiger Einwand gegen den Einsatz des FET als Alternative zum klassischen Fischtest besteht darin, dass Embryonen des Zebrafisches über keine oder nur sehr geringe Biotransformationskapazitäten verfügen. Nahrung fanden diese Einwände unter anderem in einer Arbeit von Mattingly und Toscano (2001), die zwar die Existenz der mRNA der wohl wichtigsten Isoform des zentralen Bio-

transformationsenzym Cytochrom P450, aber keine enzymatische Aktivität nachweisen konnten und daher zu dem Schluss kamen, Cytochrom P450 würde im Embryo des Zebrafischarbblings „gesilencet“.

Im November 2011 konnten aufgrund einer Aufstockung der Mittel im Rahmen des hier beschriebenen UBA-Projekts mit Hilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie („*In vivo*-EROD-Assay“) Untersuchungen zur Biotransformationskapazität in Embryonen des Zebrafischarbblings begonnen werden, die an ein Kooperationsprojekt mit der Firma Merck (Darmstadt) anschließen und in einem vom BMBF finanzierten Folgeprojekt fortgeführt werden.

Im Zuge der Entwicklung neuer analytischer Techniken ergaben sich Möglichkeiten, auch die Aktivität von Biotransformationsenzymen sehr viel spezifischer und vor allem empfindlicher nachzuweisen. So erlaubt die konfokale Laserscanningmikroskopie, lebende Embryonen des Zebrafischarbblings fast vollständig zu durchdringen und mit geeigneten fluoreszenztechnischen Markierungen Enzyme und Stoffwechselprodukte mit enormer Empfindlichkeit, Präzision und Auflösung nachzuweisen.

Die Diplomarbeit von Jens Otte beruhte auf der Idee, dass Resorufin, der als Hauptmetabolit aus der Umwandlung von Ethoxyresorufin, einem Modells substrat von Cytochrom P450, hervorgeht, eine Eigenfluoreszenz besitzt, die im CLSM sichtbar gemacht werden kann – und zwar an genau der Stelle, an der der Metabolit entsteht. Daher wird das Signal nicht wie in einer konventionellen biochemischen Reaktion z.B. durch andere Proteine (z.B. Dotterproteine) „verdünnt“ werden, und die Nachweis-schwelle sinkt. So konnte nachgewiesen werden, dass Cytochrom P450 nicht nur in 32 h alten Embryonen des Zebrafischarbblings, sondern bereits in 8 h alten Embryonen nicht nur exprimiert wird, sondern auch aktiv ist. Die Stärke des durch Cytochrom P450 ausgelösten Signals in diesem sogenannten „*In vivo*-EROD-Assay“ ist stark vom Entwicklungsstadium abhängig: Während durch β -Naphthoflavon in ≤ 48 h alten Embryonen vor allem konstitutive Signale von Cytochrom P450 1B1 ausgelöst werden, dominiert ab einem Embryonalalter von 72 h (Abschluss der Differenzierung der Leber), das induzierbare Signal von Cytochrom P450 1A in Leber, Gallenblase und Darmtrakt der Embryonen.

Aus den Befunden zeichnet sich ab, dass bereits 3 h Belastung zu einer optimalen Induktion des Cytochrom P450-Systems führt, während eine längere Belastung zu einer Abschwächung des Signals im *In vivo*-EROD-Assay führt. Das bedeutet, dass für den Nachweis der Induktion von Cytochrom P450 in lebenden Embryonen des Zebrafischarbblings eine vollständige Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt werden muss.

In einem Kooperationsprojekt mit der Firma Merck (Darmstadt) konnte im Rahmen der Dissertation von Stefan Weigt gezeigt werden, dass die Biotransformationskapazität von Embryonen des Zebrafischarbblings durch Zugabe exogener metabolischer Aktivierungssysteme durchaus gesteigert werden kann. So konnte für das Proteratogen Acetaminophen gezeigt werden, dass die Zugabe von aktivierendem S9-Mix sehr viel stärkere teratogene Effekte ausgelöst werden als ohne S9-Zugabe. In weiteren Teratogenitätsexperimenten mit Proteratogenen konnte belegt werden, dass Embryonen des Zebrafischarbblings über ein breites Spektrum von Biotransformationsenzymen verfügen.

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht in folgenden Anhängen nachzulesen:

Anhang 17 Otte, J., Schmidt, A., Hollert, H., Braunbeck, T. (2010) Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 100: 38-50.

Anhang 18 Weigt, S., Huebler, N., Braunbeck, T., von Landenberg, F., Broschard, T.H. (2010) Zebrafish teratogenicity test with metabolic activation (mDarT): Effects of phase I

activation of acetaminophen on zebrafish Danio rerio embryos. Toxicology 275: 36-49.

Anhang 19 *Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (Danio rerio) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.*

Anhang 20 *Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (Danio rerio) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.*

Executive Summary

The purpose of the project entitled „The fish embryo test as an alternative to the acute fish test – final laboratory studies and data analyses for the validation of the Fish Embryo Test for the OECD Test Guidelines Program” (FKZ 3708 65 400) was to finalize the validation of the fish embryo test (FET) as an alternative method to the acute fish toxicity test in regulatory chemical toxicity testing (OECD TG 203). Within the OECD, Germany has taken the lead for the fish embryo toxicity test project and has, thus, the responsibility for the successful completion of this project. Primarily, the project comprised the completion of all ongoing experimental work and the submission of any contribution required for phases I and II of the formal FET validation.

In 2006, the new EU chemicals policy, REACH, came into force, and there was concern that the numbers of animals used for toxicity testing would rise considerably. Therefore, all parties involved (industries, regulators, science and animal protection groups) made attempts to successfully validate potential alternative test methods. In fact, in the environment area, the FET has potential to become the first validated test method and, thus, to contribute substantially to a reduction of the animal numbers used for toxicity testing. Originally, the intention was to submit a final draft test guideline to the Working Group of National Coordinators at the OECD (WNT) for final approval in April 2012; however, due to various reasons, there was considerable delay in the completion of the validation. OECD test guidelines with final approval underlie the principals of mutual acceptance of data (MAD), and, according to REACH §13, 1, validated alternative method are to be used preferentially.

The general basis for the projects were schedules issued by responsible OECD working groups, i.e. the OECD ad hoc Expert Group for the FET and the validation management group for the FET validation. For various reasons, there was considerable delay in the validation process, and the UBA project had to be prolonged (however, with no additional funding). Validation phase II was only completed by the end of 2011, and the validation report could only be approved by the WNT (with minor amendments) in spring 2012. As a result, this report can only be submitted with 2 years delay. The draft test guideline is now being updated and will be submitted for final external expert review during summer 2012. Upon final amendments being made, the final draft test guideline will be submitted for approval by the OECD in spring 2013.

Most time and efforts within the current project was devoted to the laboratory work during phases I and II of the FET validation. From the beginning, the Heidelberg laboratory functioned as the technical lead laboratory, i.e., it had not only to draft the Standard Operation Procedure (SOP), but was responsible for any problem arising during the transfer of the SOP to other laboratories participating in the validation study. To speed up the validation process, the Heidelberg laboratory also did part and the entire range finding in phases I and II, respectively.

Apart from pure validation work, ongoing discussion about the FET repeatedly created problems, the scientific basis for the solution of whom had to be provided by the Heidelberg laboratory. In detail, the following working passages were accomplished during the current project:

- (1) Literature and laboratory works required for the validation of the FET
- (2) Investigations into the oxygen demands of zebrafish embryos
- (3) Studies on the toxicity of high strength salt solutions to zebrafish embryos
- (4) When is an experiment with zebrafish embryos an animal experiment?

- (5) Studies into potential barrier functions of the zebrafish embryo chorion I: morphology and ultrastructure of the zebrafish chorion
- (6) Studies into potential barrier functions of the zebrafish embryo chorion II: distribution of selected fluorescent dyes within the egg and the embryo of the zebrafish
- (7) Dechoriation of zebrafish embryos: a tool to improve the FET?
- (8) Supplemental studies into the permeability of the chorion of zebrafish embryos
- (9) The FET flow-through test system – the solution to all problems?
- (10) The correlation between the FET and the conventional fish acute toxicity test
- (11) Development of protocols for Fish Embryo Tests with the medaka and the fathead minnow
- (12) Investigation into the biotransformation capacities of zebrafish embryos

All studies listed above could be successfully accomplished. Thus, numerous problems associated with the FET could be resolved, and chances for acceptance of the FET as an alternative test method could be significantly improved. Studies into the permeability of the chorion and biotransformation capacities of zebrafish embryos are ongoing within other projects.

1. Literature and laboratory works required for the validation of the FET

Practical work for the FET validation started in spring 2009. As mentioned above, the Heidelberg laboratory was in charge as the technical lead laboratory, i.e., it had not only to draft the Standard Operation Procedure (SOP), but was also responsible for any problem arising during the transfer of the SOP to other laboratories participating in the validation study. To speed up the validation process, the Heidelberg laboratory also did part and the entire range finding in phases I and II, respectively. The external coordination of the validation was with Dr. Marlies Halder, ECVAM (Ispra, Italy). All decisions were taken during regular telephone conferences among the members of the FET validation management group. The statistical analyses were first carried out by Dr. André Kleinsang (ECVAM, Ispra, Italy) and then taken over by Dr. Greg Carr (Procter & Gamble; Cincinnati, USA).

A total of seven and eight Laboratories contributed to validation phases I and II, respectively. Overall, 7 and 13 substances were tested in phases I and II. The second and last phase of the FET validation within the OECD Test guideline Program could be finalized by the end of 2011. The validation report was acknowledged by the Working Group of National Coordinators (WNT) in spring 2012. The draft test guideline for the FET is being updated in spring and early summer 2012, and, subsequent to additional external expert review during late summer and autumn 2012, the final draft guidelines will be submitted for approval by the OECD in spring 2013.

For further information, please refer to the following annex(es):

- Annex 1 *Standard Operation Procedure (SOP) Fish Embryo Test.*
- Annex 2 *Report OECD-Validierung Fischembryotest Phase 1.*
- Annex 3 *Bericht zur Statistik zum Draft Report OECD-Validierung Fischembryotest.*
- Annex 4 *Draft Report OECD-Validierung Fischembryotest Phase 2*

2. Investigations into the oxygen demands of zebrafish embryos

The zebrafish embryo test is a widely used bioassay for the testing both of chemicals, whole effluents and environmental samples. Especially for the testing of sediments or whole effluents, oxygen depletion of the samples might become an important confounding factor. In the course of the diploma thesis by Ruben Strecker, a study was initiated to clarify whether low oxygen tension occurring, e.g., during the testing of sewage samples, might affect the performance of zebrafish embryos. In order to identify critical oxygen levels for early developmental stages of zebrafish, oxygen consumption of zebrafish embryos between 0 and 96 hours post-fertilization, minimum oxygen levels required by the embryos for survival as well as the effects of oxygen depletion following exposure to model sediments were determined. No significant effects on zebrafish embryo development were for oxygen concentrations between 7.15 and 3.33 mg/L, whereas at concentrations between 3.0 and 2.0 mg/L minor developmental retardations were observed, yet without any pathological consequences. Oxygen concentrations lower than 0.88 mg/L turned out to be 100 % lethal. In the sediment contact tests with zebrafish embryos, native sediments rich in organic materials rapidly developed strongly hypoxic conditions, particularly at the sediment-water interface (0 to 500 µm distance to the sediment). In conclusion, oxygen demands by zebrafish embryos are extremely low, and it is highly unlikely that low oxygen tension might seriously interfere with toxicity testing in the FET.

For further information, please refer to the following annex(es):

Details zu den Untersuchungen sind im Abschlussbericht in folgenden Anhängen nachzulesen:

Annex 5 *Ruben Strecker 2008 Investigations into the oxygen demands of the zebrafish (Danio rerio) in sediment contact tests. Diploma thesis, University of Heidelberg.*

Annex 6 *Strecker, R., Seiler, T.B., Hollert, H., Braunbeck, T. (2011) Oxygen requirements of zebrafish (Danio rerio) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. Comp. Biochem. Physiol. 153 C: 318-327.*

3. Studies on the toxicity of high strength salt solutions to zebrafish embryos

Within the scope of her dissertation, Kirsten Henn had a closer look at potassium chloride (KCl), a well-known outlier in the correlation between the FET and the acute fish toxicity test. KCl was compared to other inorganic salts such as K₂SO₄, KHCO₃, NaCl, Na₂SO₄, and NaHCO₃ both in the standard and an extended version of the FET. Results indicate that only 24 and 48 h data for KCl represent outliers; data for the extended FET fit quite well with conventional acute toxicity data. As potential explanation for this transient deviation, differential regulation of uptake or different localization of ion transporters in the embryo and adult fish are discussed. Since the final test protocol of the FET will definitely be based on 96 or 120 h exposure, even FET data for KCl would not deviate from corresponding *in vivo* values.

For further information, please refer to the following annex(es):

Annex 7 *Wendler, K., Strecker, R., Braunbeck, T. (2011) Toxicity of anionic salts in the fish embryo test with the zebrafish (Danio rerio). Manuscript submitted to Comp. Biochem. Physiol.*

4. When is an experiment with zebrafish embryos an animal experiment?

The zebrafish has become a very popular model for biomedical research and (eco)toxicology. Particularly embryos are receiving increasing attention, since they are considered as replacement for animal

experiments. Zebrafish embryos allow analysis of multiple endpoints from acute and developmental toxicity to complex functional genetic analyses. Particularly more complex endpoints require post-hatch eleutheroembryo stages. According to the new EU Directive 2010/63/EU on protection of animals used for scientific purposes, earliest life-stages are not defined as protected and, therefore, not regulated. Independent feeding is considered as the key for regulations. However, there is large variation in the interpretation of this criterion. Since some assays require post-hatched stages up to 120 hours post fertilization (hpf), literature is reviewed to evaluate if this stage could still be considered as non-protected. We conclude that zebrafish larvae can indeed be regarded as independently feeding from 120 hpf. Experiments with zebrafish should thus be regulated from 120 hpf onwards.

For further information, please refer to the following annex(es):

Annex 8 *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. Reprod. Toxicol. 33:245-253.*

5. Studies into potential barrier functions of the zebrafish embryo chorion I: morphology and ultrastructure of the zebrafish chorion

A major objection to the use of the FET is the potential barrier function of the egg shell, the chorion. In order to provide base study for the understanding of the role of the chorion, the bachelor thesis of Frauke Fedderwitz was designed to provide an in-depth description of the structure and ultrastructure of the zebrafish chorion. Both under the light and the electron microscope, the chorion showed an organization into three layers, and numerous regularly spaced pores run across these layers. Most likely, the pores serve as channels for the transfer of vitellogenin into the yolk; in later developmental stages, the pores are closed. In the electron microscope, the pores could be shown to be formed by microvilli from surrounding follicular cells. Number and dimensions of the pores do not change during development. In contrast, most likely under the influence of hatching enzymes, the outer surface of the chorion changes during egg maturation.

For further information, please refer to the following annex(es):

Annex 9 *Frauke Fedderwitz 2008 Morphology and ultrastructure of the chorion of the zebrafish (Danio rerio). Bachelor thesis, University of Heidelberg.*

6. Studies into potential barrier functions of the zebrafish embryo chorion II: distribution of selected fluorescent dyes within the egg and the embryo of the zebrafish

In order to further study the barrier function of the zebrafish chorion, eggs were incubated with non-toxic fluorescent dyes. The transfer of the dyes was followed by means of laser scanning electron microscopy. Water-soluble dyes such as rhodamine b or sulforhodamine b readily accumulated within the yolk; for sulforhodamine b, however, due to its charged moieties, it took at least 48 h to cross the chorion. Most likely, the characteristics of the chorion change during the second day of development. The smallest molecule tested, fluorescein, accumulated within the blood stream and the brain as early as 24 hpf, whereas 2,7-dichlorofluorescein und 5-carboxy-2,7-dichlorofluorescein only get across the chorion by 48 hpf. Dextrans with a molecular weight of ≥ 3 kDa and labeled with fluorescein fail to cross the chorion, whereas smaller dextrans pass. The uptake of fluorescein is strongly enhanced by the presence of the solvent DMSO at concentrations > 0.1 %. The study documents that the permeabil-

ity of the zebrafish chorion not only depends on lipophilicity, but also on the polarity of specific side chains and the complexity of the entire molecule.

For further information, please refer to the following annex(es):

Annex 10 *Britta Kais 2009 The distribution of different fluorescence dyes in the egg and embryo of the zebrafish (Danio rerio). Diploma thesis, University of Heidelberg.*

7. Dechoriation of zebrafish embryos: a tool to improve the FET?

Prior to hatching, the zebrafish embryo is surrounded by an acellular envelope, the chorion. Despite repeated speculations, it could not be clarified unequivocally whether the chorion represents an effective barrier and, thus, protects the embryo from exposure to distinct chemicals. Potentially, there is a risk of generating false negative results in developmental toxicity studies due to negligible permeation of the compound across the chorion. The simplest way to exclude this is to remove the chorion and expose the “naked” embryo. However, so far, only few protocols exist for fish embryo dechoriation, and survival rates of dechoriated embryos have never been subjected to statistical analysis. Since, for use in the context of the zebrafish embryo assay for chemical toxicity assessment, reproducibly high survival rates are of fundamental importance and since a protocol for dechoriation for zebrafish did not exist so far, the present study was designed to develop and optimize a dechoriation procedure with reproducibly high survival rates. With appropriate modifications of the fish embryo test protocol, embryos can be dechoriated at 24 hours post-fertilization (hpf) with survival rates of ≥ 90 %. However, for fish embryo tests with dechoriated embryos, the standard positive control test substance, 3,4-dichloroaniline, should be replaced by another compound, e.g., acetone, since 3,4-dichloroaniline exerts its effects during the first 24 h of development. Dechoriation of younger stages (< 24 hpf) is generally possible, but with maximum survival rates between 60 and 80 %. The effect of dechoriation was demonstrated with the cationic polymer Luviquat HM 552, which is blocked by the chorion non-dechoriated embryos due to its molecular weight of ~ 400000 Dalton, but becomes strongly toxic after dechoriation.

For further information, please refer to the following annex(es):

Annex 11 *Henn, K., Braunbeck, T. 2010 Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. 153C: 91-98.*

8. Supplemental studies into the permeability of the chorion of zebrafish embryos

In November 2011, additional funding by the UBA allowed more-in-depth studies into the permeability of the zebrafish chorion. In fact, previous experiments (cf. chapter 6) could be repeated, and more detailed knowledge could be gained about the properties of the chorion. The most important findings can be summarized as follows:

- (1) Water-soluble, non-dissociating substances readily pass the chorion of the zebrafish and enter the embryo.
- (2) Substances with charged side chains and a molecular weight ≥ 3 kDa only pass the chorion from 48 hours post-fertilization (hpf). Apparently, during development, the chorion changes its properties and, thus, facilitates increased uptake rates from 48 hpf.
- (3) Substances with a molecular weight > 34 kDa cannot pass the zebrafish chorion.

- (4) The molecular configuration takes an influence on the uptake of the substance across the chorion into the embryo of the zebrafish.
- (5) DMSO concentrations > 0,1 % reduce the barrier function of the chorion of the zebrafish, if there is any.

For further information, please refer to the following annex(es):

Annex 12 *Kais, B., Keiter, S., Schneider, K.E., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T. (2012) DMSO modifies the permeability of the zebrafish (Danio rerio) chorion – implications for the fish embryo test (FET). Comp. Biochem. Physiol. eingereicht.*

9. The FET flow-through test system - the solution to all problems?

Since adsorption of the test chemical to surfaces may reduce available exposure concentrations, a flow-through system for the FET using modified commercially available polystyrene 24-well microtiter plates was developed, thus combining the advantages of the standard FET with those of continuous delivery of test substances. The advantages of the design presented include: small test footprint, availability of adequate volumes of test solution for subsequent chemical analysis, and sufficient flow to compensate for effects of non-specific adsorption within 24 h. The flow-through test system can also be utilized to conduct longer-term embryo larval fish tests, thus offering the possibility for teratogenicity testing.

For further information, please refer to the following annex(es):

Annex 13 *Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendler, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio). Toxicol. In Vitro 23: 1436-1442.*

10. The correlation between the FET and the conventional fish acute toxicity test

The fish acute toxicity test is a mandatory component in the base set of data requirements for ecotoxicity testing. The fish acute toxicity test is not compatible with most current animal welfare legislation because mortality is the primary endpoint and it is often hypothesized that fish suffer distress and perhaps pain. Animal alternative considerations have also been incorporated into new European REACH regulations through strong advocacy for the reduction of testing with live animals. One of the most promising alternative approaches to classical acute fish toxicity testing with live fish is the fish embryo toxicity (FET) test. The FET has been a mandatory component in routine whole effluent testing in Germany since 2005 and has already been standardized at the international level. In order to analyze the applicability of the FET also in chemical testing, a comparative re-evaluation of both fish and fish embryo toxicity data was carried out for a total of 143 substances, and statistical approaches were developed to evaluate the correlation between fish and fish embryo toxicity data. Results confirm that fish embryo tests are neither better nor worse than acute fish toxicity tests and provide strong scientific support for the FET as a surrogate for the acute fish toxicity test. The number of outliers is extremely small, so that the risk of false positive and negative results is low.

For further information, please refer to the following annex(es):

- Annex 14 Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T. (2009) *Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. 149C: 196-209.*

11. Development of protocols for Fish Embryo Tests with the medaka and the fathead minnow

Since the proposal for this projects concentrated on zebrafish, little attention was given to protocols with other OECD species such as medaka (*Oryzias latipes*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*). Likewise, the *ad hoc* expert group had recommended developing the zebrafish protocol further first, since the other species apparently lagged behind considerably. In fact, appropriate adaptation of the zebrafish protocol to the needs of the other fish species allowed an almost identical FET procedure for these species. Since in 2010 discussions indicated that the acceptability of the FET in the US might be improved, if there were a corresponding protocol for the fathead minnow, the diploma thesis of Svenja Böhler was initiated to finalize a draft fish embryo test protocol for the fathead minnow. Moreover, structural and ultrastructural studies revealed differences between the zebrafish and the fathead minnow chorion, which might explain the apparent lower sensitivity of the fathead minnow.

For further information, please refer to the following annex(es):

- Annex 15 Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E. Leist, E., Rudolf, R., Seitz, N. (2005) *Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species B an update. ALTEX 22: 87-102.*
- Annex 16 Böhler, S. (2012) *The fathead minnow embryo as a model for the development of alternative testing methods in ecotoxicology. Diploma thesis, University of Heidelberg.*

12. Investigation into the biotransformation capacities of zebrafish (*Danio rerio*) embryos

As probably any living organism, fish are capable of metabolizing most xenobiotics, as these enter their bodies. In most cases, this biotransformation results in detoxification. However, given that most biotransformation reactions are based on normal physiological processes which have evolved for non-toxic external and internal substrates, biotransformation may also result in toxification, i.e. bioactivation of xenobiotics. As a consequence, in order to reduce the risk of false negatives, alternative methods for the acute fish test should, therefore, also be capable of bioactivation.

A frequent objection to the FET is based on the assumption that biotransformation capacities in zebrafish are quite low and only develop during later developmental stages of the embryo. Such assumption found further support in publications such as that by Mattingly and Toscano (2001) who failed to detect any enzymatic activity cytochrome P450, a major biotransformation enzyme, although the mRNA could readily be detected. Their conclusion was that P450 was silenced in zebrafish embryos.

In November 2011, based on additional funding by the UBA, studies in the Heidelberg laboratory into the biotransformation capacities could be reinforced. By means of confocal laser scanning microscopy, an *in vivo* EROD assay was developed, and additional studies following up a recent collaboration with Merck (Darmstadt) could be initiated. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) not only allows a much higher resolution in the localization of molecular targets, but also allows the visualization within

living organisms. Such methods avoid dilution effects of conventional biochemical methods, i.e., they get rid of huge protein burdens by the yolk.

The diploma thesis of Jens Otte is based in the observation that resorufin, the cytochrome P450-dependent metabolite of the model substrate ethoxyresorufin, shows an autofluorescence, which can be visualized by means of CLSM in a very precise and even semiquantitative fashion. To assess basal and β -naphthoflavone-induced CYP1 activity, the 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) assay was developed further for use in CLSM and spectrometry. Following exposure to selected cytochrome P450 inducers, zebrafish embryos were dechorionated, anaesthetized and inspected *in vivo* under CLSM. Alternatively, embryos were homogenized, and EROD activity was measured using classical spectrometry *in vitro*. CLSM of CYP-induced fluorescence allowed for the *in vivo* detection of CYP1 enzyme activity down to the cellular level as early as in the gastrulation stage. Basal and induced CYP1 activity was detected at all time points examined from 8 h post-fertilization to early adulthood and showed a highly dynamic spatio-temporal pattern throughout zebrafish development. Basal and induced EROD activity was prominent in tissues of the cardiovascular system, the urinary tract, the digestive system, and parts of the brain as well as in the central portion of the eye and the otic vesicle during distinct stages of development. The differentiation between constitutive and induced spatio-temporal patterns of CYP1 activity was possible even as early as in the gastrula stage.

Thus, cytochrome P450 activity could clearly be shown not only in 32 h, but also in 8 h old zebrafish embryos. However, the signal strength of this *in vivo* EROD assay turned out to be strongly dependent on the developmental stage of the embryo: Whereas β -naphthoflavone induced constitutive signals of cytochrome P450 1B1 in zebrafish embryos younger than 48 hpf, signals by inducible cytochrome P450 1A dominate in embryos from 72 hpf (in fact, when the liver is fully developed and functionally active). As a consequence, early signals prevail in, e.g., brain, eye and otoliths, whereas signals in embryos ≥ 72 h display strong P450 activity in liver, gall bladder and intestinal tract.

Results further indicate that the cytochrome P450-dependent induction in zebrafish embryos is so sensitive that extended exposure to inducers rapidly leads to an overcharge of the system. As a consequence, the *in vivo* EROD assay with zebrafish embryos is most effective with 3 h old embryos. Moreover, a further consequence is that P450 induction studies in zebrafish embryos will always have to cover a full concentration-response relationship.

In a collaborative project with Merck (Darmstadt), Stefan Weigt has shown in his PhD thesis that zebrafish embryos first documented that biotransformation capacities in the FET or the zebrafish embryo teratogenicity assay can be significantly increased by addition of external bioactivating agents such as S9 mixes. However, more-in-depth studies in zebrafish embryos revealed that most proteratogens can be activated at sufficient rates even without addition of external metabolizing capacities. Thus, Stefan Weigt was able to demonstrate that zebrafish embryos not only have cytochrome P450 1A capacities, but also various other cytochrome P450 isoforms.

For further information, please refer to the following annex(es):

- Annex 17 *Otte, J., Schmidt, A., Hollert, H., Braunbeck, T. (2010) Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (Danio rerio). Aquat. Toxicol. 100: 38-50.*
- Annex 18 *Weigt, S., Huebler, N., Braunbeck, T., von Landenberg, F., Broschard, T.H. (2010) Zebrafish teratogenicity test with metabolic activation (mDarT): Effects of phase I activation of acetaminophen on zebrafish Danio rerio embryos. Toxicology 275: 36-49.*
- Annex 19 *Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish*

(Danio rerio) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

Annex 20 Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.

Inhalt

Zusammenfassung	1
Einleitung	2
1. Arbeiten im Rahmen der OECD-Validierung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch3	3
2. Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf von Embryonen des Zebrafisches9	9
3. Untersuchungen zur Toxizität von hoch konzentrierten Salzlösungen auf Embryonen des Zebrafisches.....11	11
4. Ab wann ist ein Versuch mit Fischembryonen ein Tierversuch gemäß der neuen EU Richtlinie 2010/63?	13
5. Untersuchungen zur Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebrafisches I: Morphologie und Ultrastruktur des Chorions.....15	15
6. Untersuchungen zur Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebrafisches II: Die Verteilung von ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen in Ei und Embryo des Zebrafisches.....18	18
7. Die Dechorionierung von Eiern des Zebrafisches: ein Werkzeug zur Verbesserung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch?.....22	22
8. Ergänzende Untersuchungen zur Permeabilität des Chorions des Zebrafisches (<i>Danio rerio</i>).....24	24
9. Der Fischembryotest im Durchfluss – die Lösung aller Probleme?.....33	33
10. Die Korrelation zwischen dem Fischembryotest und dem akuten Fischtest	35
11. Entwicklung von Protokollen zu Fischembryotests mit Dickkopfritze und Medaka	38
12. Untersuchungen zur Biotransformationskapazität in Embryonen des Zebrafisches (<i>Danio rerio</i>)	41
Anhänge	51

Zusammenfassung

Der vorliegende Bericht fasst die Ergebnisse des UBA-Projekts mit dem Titel „Der Fischembryotest als Alternativmethode für den akuten Fischttest – abschließend notwendige Laboruntersuchungen und Datenanalysen zur Validierung des Fischembryotests für das OECD Prüfrichtlinienprogramm“ (FKZ 3708 65 400) zusammen. Im Einzelnen wurden im Hinblick auf die Etablierung des Fischembryotests mit dem Zebraärbliug (*Danio rerio*) folgende Einzeluntersuchungen durchgeführt:

- (1) Arbeiten im Rahmen der OECD-Validierung des Fischembryotests mit dem Zebraärbliug
- (2) Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf von Embryonen des Zebraärbliugs
- (3) Untersuchungen zur Toxizität von hoch konzentrierten Salzlösungen auf Embryonen des Zebraärbliugs
- (4) Ab wann ist ein Versuch mit Fischembryonen ein Tierversuch gemäß der neuen EU Richtlinie 2010/63?
- (5) Untersuchungen zur Barrierefunktion des Chorions des Zebraärbliugs I: Morphologie und Ultrastruktur des Chorions
- (6) Untersuchungen zur Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebraärbliugs II: Die Verteilung von ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen in Ei und Embryo des Zebraärbliugs
- (7) Die Dechorionierung von Eiern des Zebraärbliugs: ein Werkzeug zur Verbesserung des Fischembryotests mit dem Zebraärbliug?
- (8) Ergänzende Untersuchungen zur Permeabilität des Chorions des Zebraärbliugs
- (9) Der Fischembryotest im Durchfluss – die Lösung aller Probleme?
- (10) Die Korrelation zwischen dem Fischembryotest und dem konventionellen Fischttest
- (11) Entwicklung von Protokollen zu Fischembryotests mit Dickkopfelritze und Medaka
- (12) Untersuchungen zur Biotransformationskapazität von Embryonen des Zebraärbliugs

Alle Untersuchungen konnten erfolgreich abgeschlossen werden, womit wichtige Fragen zur Vergleichbarkeit des Fischembryotest als Alternativmethoden zum akuten Fischttest beantwortet werden konnten. Die Untersuchungen zur Barrierefunktion des Chorions und zur Biotransformationskapazität von Embryonen des Zebraärbliugs werden im Rahmen weiterer Projekte fortgeführt werden.

Die zwei Phasen der Validierung des Fischembryotests im Rahmen des OECD-Prüfrichtlinienprogramms konnten mit Ende des Jahres 2011 abgeschlossen werden. Die beiden Validierungsberichte der Phase 1 und Phase 2 wurden im Frühjahr 2011 und 2012 von der Arbeitsgruppe der Nationalen KoordinatorInnen des OECD-Prüfrichtlinienprogramms (Working Group of National Coordinators for the OECD Test Guideline Programme - WNT) verabschiedet und als OECD Monographien in der „Series on Testing and Assessment“, veröffentlicht. Der Entwurf für die OECD-Prüfrichtlinien wurde auf Basis der Erkenntnisse der Validierungsstudie und der Kommentare der OECD Mitgliedsstaaten überarbeitet und soll nach einer unabhängigen weiteren Kommentierung in den OECD Mitgliedsstaaten im Frühjahr 2013 dem WNT zur Verabschiedung vorgelegt werden.

Einleitung

Unter Förderung durch das Ministerium für Wissenschaft und Kunst des Landes Baden-Württemberg waren am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg grundlegende Arbeiten zur „Optimierung und Normierung des Fischeitests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) als Ersatzmethode zum Fischtest nach dem Abwasserabgabengesetz der Bundesrepublik Deutschland“ durchgeführt worden; die Ergebnisse dieses Projekts wurden unmittelbar bei der Abfassung der DIN-Norm 38415-6 T6 („Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen“) umgesetzt, die 2003 für die Prüfung der Toxizität von Abwasser obligatorisch den Fischtest ersetzte.

Unter Förderung durch das Umweltbundesamt wurde in Jahren 2004 bis 2005 am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg der Text für einen Vorschlag für eine OECD-Norm für den Fischembryotest als Alternativmethode zum Fischtest in der Chemikalienprüfung erstellt, der im Frühjahr 2006 bei der OECD eingereicht wurde (FET – „Fish Embryo Test“). Der im Wesentlichen auf Untersuchungen mit dem Zebrafisch basierende Vorschlag wurde durch eine umfangreiche Literaturstudie (Draft Background Paper) begleitet, die alle bis dahin publizierten Toxizitätsexperimente mit Eiern, Embryonen und Larven von Fischen zusammenfasst.

Im Dezember 2006 wurden die internationalen Kommentare zu dem Vorschlag für die OECD-Guideline von der OECD in einem 44seitigen Dokument zusammengefasst. Die Kommentare machten weitere Arbeiten zur Optimierung und Validierung des Fischembryotests nötig, die im vorliegenden Bericht zusammengefasst werden:

- (1) Arbeiten im Rahmen der OECD-Validierung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch
- (2) Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf von Embryonen des Zebrafisches
- (3) Untersuchungen zur Toxizität von hoch konzentrierten Salzlösungen auf Embryonen des Zebrafisches
- (4) Ab wann ist ein Versuch mit Fischembryonen ein Tierversuch gemäß der neuen EU Richtlinie 2010/63?
- (5) Untersuchungen zur Barrierefunktion des Chorions des Zebrafisches I: Morphologie und Ultrastruktur des Chorions
- (6) Untersuchungen zur Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebrafisches II: Die Verteilung von ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen in Ei und Embryo des Zebrafisches
- (7) Die Dechorionierung von Eiern des Zebrafisches: ein Werkzeug zur Verbesserung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch?
- (8) Ergänzende Untersuchungen zur Barrierewirkung des Chorions des Zebrafisches
- (9) Der Fischembryotest im Durchfluss – die Lösung aller Probleme?
- (10) Die Korrelation zwischen dem Fischembryotest und dem akuten Fischtest
- (11) Entwicklung von Protokollen zu Fischembryotests mit Dickkopflurche und Medaka
- (12) Untersuchungen zur Biotransformationskapazität von Embryonen des Zebrafisches

1. Arbeiten im Rahmen der OECD-Validierung des Fischembryotests mit dem Zebraärbübling

Im Rahmen der Arbeiten zur OECD-Validierung des Fischembryotests übernahm das Heidelberger Labor die Entwicklung der Standard Operation Procedure (SOP) sowie die Aufgaben des Technical Lead Laboratory. In den zwei Phasen der OECD-Validierung konnte anhand von insgesamt 20 Substanzen mit unterschiedlicher Toxizität und verschiedenen Wirkmechanismen erfolgreich die Reproduzierbarkeit des Fischembryotests sowohl innerhalb eines Labors als auch zwischen den insgesamt 11 Laboratorien, die an beiden oder einer der beiden Phasen teilnahmen, dokumentiert werden. Als einziges Labor testete das Heidelberger Labor alle 20 Testsubstanzen in den Phasen 1 und 2.

Standard Operation Procedure (SOP) Fish Embryo Test (Anhang 1).

Report OECD-Validierung Fischembryotest Phase 1 (Anhang 2).

Bericht zur Statistik zum Draft Report OECD-Validierung Fischembryotest (Anhang 3).

Draft Report OECD-Validierung Fischembryotest Phase 2 (Anhang 4).

Die Arbeiten zur Validierung des Fischembryotests mit dem Zebraärbübling im Rahmen des OECD-Protokolls begannen im Frühjahr 2009. Das Heidelberger Labor erstellte die Standard Operation Procedure (SOP) für den Vergleichstest des Fischembryotest und optimierte diese fortlaufend in Zusammenarbeit mit den beteiligten Laboratorien. Die aktuelle SOP legt diesem Bericht als Anhang 1 bei.

Die externe Koordination der OECD-Validierung wurde Dr. Marlies Halder, European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) durch die OECD übertragen. Als Begleitgremium wurde eine Validation Management Group (VMG) eingerichtet, die alle Entscheidungen im Rahmen von Telefonkonferenzen traf (Abb. 1).

	Name	Affiliation	Role
Koordination	Marlies Halder François Busquet	JRC/IHCP/ECVAM Ispra, ITALY	Coordination/reporting
Statistik	André Kleensang	JRC/IHCP/ECVAM Ispra, ITALY	Data analysis for Phase 1a
	Patric Amcoff	OECD Environment, Health and Safety Division, Environment Directorate Paris, FRANCE	OECD Test Guideline Program
Technisches Leitlabor	Thomas Braunbeck	University of Heidelberg Heidelberg, GERMANY	Lead laboratory & Umweltbundesamt representative (until April 2010)
	Scott Belanger	Procter & Gamble Cincinnati, OH, USA	Participating laboratory
Statistik	Greg Carr	Procter & Gamble Cincinnati, OH, USA	Data analysis for Phase 1b
	Adam Lillicrap	NIVA Oslo, NORWAY	Independent adviser
	Susanne Walter-Rohde	Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, GERMANY	Lead country OECD project 2.7 (joined the VMG in April 2010)

Abb. 1: Validation Management Group bei der OECD-Validierung des Fischembryotests

Die begleitende statistische Auswertung wurde zunächst von Dr. André Kleensang (ECVAM) und später von Dr. Greg Carr (Procter & Gamble; Cincinnati, USA) übernommen. Das Heidelberger Labor übernahm die Aufgabe des Technical Lead Laboratory und war damit für die Lösung aller technischer Probleme in den teilnehmenden Laboratorien und das Training der Labore (Tab. 1) zuständig.

Tab. 1: An der OECD-Validierung des Fischembryotests beteiligte Laboratorien

Laboratory	Responsible
University of Heidelberg, Heidelberg, GERMANY ¹	Prof. Dr. Thomas Braunbeck
Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA ²	Scott Belanger, PhD
Ipo-Pszczyna, Pszczyna, POLAND ³	<u>Przemysław Fochtman</u> , PhD
IVM, Amsterdam, THE NETHERLANDS	Juliette Legler, PhD
UFZ, Leipzig, GERMANY	Stefan Scholz, PhD
RIVM, Bilthoven, THE NETHERLANDS	Leo van der Ven, <u>PhD</u>
VITO, Mol, BELGIUM	Hilda Witters, PhD

¹ Lead laboratory

² Chemical analyses as described in Sections 7 and 8.

³ Ipo-Pszczyna could only participate in Phase 1a

Die OECD-Validierung des Fischembryotests wurde in drei Phasen angelegt:

- (1) Phase 1a: Nachweis der Übertragbarkeit der SOP auf die an der Validierung beteiligten Laboratorien (Modellsubstanz: 3,4-Dichloranilin).
- (2) Phase 1b: Nachweis der Intra- und Inter-Laborvarianz (Reproduzierbarkeit) des Fischembryotests mit 7 Testsubstanzen (3,4-Dichloranilin, Triclosan, Dibutylmaleat, 2,3,6-Trimethylphenol, 6-Methyl-5-hepten-2-on, Natriumchlorid, Ethanol). Die Auswahl der Substanzen sollte ein breites Toxizitätsspektrum, verschiedene Wirkmechanismen, Substanzklassen (Pestizid, Arzneimittel, Industriechemikalie) sowie ein gewisses Spektrum der Lipophilie und Molekülgröße abdecken (Tab. 2, 3).
- (3) Phase 2: Nachweis der Reproduzierbarkeit des Fischembryotests mit 13 weiteren Testsubstanzen (Dimethylsulfoxid, Triethylenglykol, Carbamazepin, 1-Oktanol, 2,4-Dinitrophenol, Malathion, Prochloraz, Kupfer(II)sulfat-pentahydrat, 4,6-Dinitro-o-cresol, Natriumtetradecylsulfat, Methylquecksilber(II)chlorid, Merquat-280, Luviquat HM 522). Die Auswahl der Substanzen sollte die in Phase 1 berücksichtigten Auswahlkriterien wie Toxizitätsspektrum, verschiedene Wirkmechanismen, Substanzklassen (Pestizid, Arzneimittel, Industriechemikalie) sowie Lipophilie und Molekülgröße weiter abdecken.

Aufgrund technischer Probleme in den beteiligten Laboratorien verzögerte sich die Durchführung der OECD-Validierung des Fischembryotests immer wieder, so dass Phase 2 erst im Herbst 2011 abgeschlossen werden konnte. In Phase 2 übernahm das Heidelberger Labor das „Range-Finding“, (Vortest zur Ermittlung des relevanten Konzentrationsbereichs) für insgesamt 11 der 13 Testsubstanzen (Tab. 5). Der abschließende Validierungsbericht der Phase 2 wurde im Frühjahr 2012 der Arbeitsgruppe der Nationalen Koordinatoren des OECD-Prüfrichtlinienprogramms (WNT) vorgelegt und verabschiedet

und einem externen Begutachtungsverfahren durch ESAC (Scientific Advisory Committee of ECVAM) zugeleitet. Der auf Basis der Ergebnisse der Validierungsstudie überarbeitete Prüfrichtlinienentwurf wird in 2012 durch die OECD Mitgliedsstaaten erneut kommentiert. Der Prüfrichtlinienentwurf soll dann im Frühjahr 2013 dem WNT zur Verabschiedung vorgelegt werden.

Tab. 2: Physikalisch-chemische Eigenschaften und Testkonzentrationen der in Phase 1 der OECD-Validierung des Fischembryotests getesteten Substanzen

Chemical	Fish Toxicity	CAS Number	Catalogue Number	Lot Number	MW (g/mol)	Log Kow	HLC (Pas-m ³ /mole)	Solubility (mg/L)	Test Concentrations
Triclosan	+++	3380-34-5	72779	1412854	289.55	4.76	0.00051	4.621	0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 mg/L
Dibutyl maleate	++	105-76-0	D47102	07715ch	228.29	4.16	0.0768	8.709	0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/L
2,3,6-Trimethylphenol	++	2416-94-6	92693	1290095	136.2	3.15	0.399	1580	8, 12, 18, 27, 40.5 mg/L
3,4-Dichloroaniline	++	95-76-1	35827	6080x	162.02	2.69	0.19	337.9	0.5, 1, 2, 3.7, 4, 8 mg/L
6-Methyl-5-heptene-2-one	+	110-93-8	67320	S52972-429	126.2	2.06	21.5	4364.1	25, 42.5, 72.25, 122.825, 208.03 mg/L
Sodium chloride	-	7647-14-5	S7653	106K0081	58.44	-0.46	3.580E-025	359000	1, 2, 4, 8, 16 g/L
Ethanol	-	64-17-5	34923	sze91380	46.07	-0.31	0.574	1 x 10 ⁶	5.3, 8, 12, 18, 27 g/L

- = non-toxic (LC50 > 100 mg/L); + = moderately toxic (LC50 from 10 to 100 mg/L); ++ = toxic (LC50 from 1 to 10 mg/L); +++ = very toxic (LC50 < 1 mg/L); MW = Molecular Weight; HLC = Henry's Law Constant. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich; in Phase 1b, Laboratory C used sodium chloride from a different supplier to perform run n°3. Note log Kow, HLC, and solubility were estimated using EPISUITE 4.0 (2008) except when measured values were available (cited within EPISUITE).

Tab 3: Physikalisch-chemische Eigenschaften und Testkonzentrationen der in Phase 2 der OECD-Validierung des Fischembryotests getesteten Substanzen

Chemikalie	Fisch-toxizität	CAS Nummer	Katalog-Nummer	Lot Number	MW (g/mol)	Log Kow	HLC (Pas m ³ /mole)	Testkonzentrationen (mg/L)
Methylmercury (II) chloride	+++	115-09-3	33368	szba172x	251.08	0.41 ^{db}	NA	0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1
Copper (II) sulfate pentahydrate	+++	7758-99-8	209198	mkbd0338	249.68	NA	NA	0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4
4,6-Dinitro- <i>o</i> -cresol	+++	534-52-1	45464	sze6159x	198.14	2.13 ^{db}	1.4E-06 ^{db}	0.18, 0.32, 0.58, 1.05, 1.89
2,4-Dinitrophenol	+++	51-28-5	34334	sze9167x	184.11	1.67 ^{db}	8.06E-08 ^{db}	0.625, 1.25, 2.5, 5, 10
Merquat 100	++	26062-79-3	409022	mkbf20418v	200,000-350,000	-2.49 ^{est}	7.2E-12 ^{est}	0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6
Luviquat HM 552	++	95144-24-4	59059	1322472	~400,000	1.38 ^{est}	1.87E-14 ^{est}	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2
Tetradecyl sulfate sodium salt	++	1191-50-0	293938	0600LC	316.43	2.67 ^{est}	3.25E-07 ^{est}	0.156, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5
Malathion	++	121-75-5	PS86	447-115b	330.4	2.36 ^{db}	8.39E-10 ^{est}	0.5, 1, 2, 4, 8
Prochloraz	++	67747-09-5	45631	sze6220x	376.67	4.1 ^{db}	7.58E-12 ^{est}	0.5, 1, 2, 4, 8

Chemikalie	Fisch-toxizität	CAS Nummer	Katalog-Nummer	Lot Number	MW (g/mol)	Log Kow	HLC (Pas m3/mole)	Testkonzentrationen (mg/L)
1-Octanol	+	111-87-5	293245	stbb5181	130.23	3.00 ^{db}	2.45E-05 ^{db}	2.5, 5, 10, 20, 40
Carbamazepine	+	298-46-4	C4024	119k1317v	236.28	2.45 ^{db}	1.08E-10 ^{est}	54.7, 76.5, 107.1, 150, 210
Dimethyl sulfoxide	-	67-68-5	10282	0215	78.13	-1.35 ^{db}	4.96 E-08 ^{est}	10, 17, 28.9, 49.13, 83.521
Triethylene glycol	-	112-27-6	T59455	stbb7542	150.17	-1.75 ^{est}	3.16E-011 ^{est}	20, 30, 45, 67.5, 101.25

- = non-toxic (LC50>100 mg/L); + = moderately toxic (LC50=10-100 mg/L); ++ = toxic (LC50=1-10 mg/L); +++ = very toxic (LC50<1 mg/L); NA = Not available; MW = Molecular Weight; HLC = Henry's Law Constant; db = experimental database match; est = estimated; Note: log Kow and HLC were estimated using EPISUITE 4.0 (2008) except when measured values were available (cited within EPISUITE). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich except for dimethyl sulfoxide (Guessing GmbH)

Die Ergebnisse von Phase 1 der OECD-Validierung des Fischembryotests lassen sich wie folgt zusammenfassen und sind in den OECD Validierungsberichten dokumentiert (Anhänge 5 und 7):

- (1) Die Reproduzierbarkeit des Fischembryotests innerhalb eines Labors konnte von allen beteiligten fünf Laboratorien mit mindestens 3 unabhängigen Wiederholungen mit der Testsubstanz 3,4-Dichloranilin erfolgreich demonstriert werden (Korrelationskoeffizient CV < 30 %).
- (2) Auch die Reproduzierbarkeit des Fischembryotests zwischen den beteiligten Labors konnte mit einem akzeptablen Variationskoeffizienten (CV) von < 30% dokumentiert werden (max. Abweichung um einen Faktor von 1,6; Tab. 5).
- (3) Mit Ausnahme von 6-Methyl-5-hepten-2-on, das Probleme bei der Löslichkeit der Substanz zeigte (Interlabor-CV 58 %), konnte für alle Substanzen der Phase 1 die Reproduzierbarkeit des Fischembryotests erfolgreich dokumentiert werden (Interlabor-CV max. 23,6 %; Abb. 2).

Tab. 4: Intra- und Inter-Labor-Variabilität in der Toxizität von 3,4-Dichloranilin im Fischembryotest im Rahmen der OECD-Validierung

3,4-DCA	Combined LC50 (mg/L)		Intra-laboratory CV (%)	
	48h	96h	48h	96h
Laboratory A	3.7*	3.5*	58.8*	58.5*
Laboratory B	1.2*	1.2*	27.2*	17.1*
Laboratory C	3.1	2.4	7.3	16.6
Laboratory D	2.8	2.6	10.0	4.4
Laboratory E	4.5	4.1	20.4	18.9
Laboratory F	3.0	2.6	24.6	17.9
Laboratory G	4.3	3.4	14.9	17.2
			Inter-laboratory CV (%)	
All laboratories	3.2	2.7	33.7	33.4
Five laboratories (C-G) with 3 runs	<u>n.c.</u>	<u>n.c.</u>	22.1	23.6

* = based on two runs, n.c. = not calculated

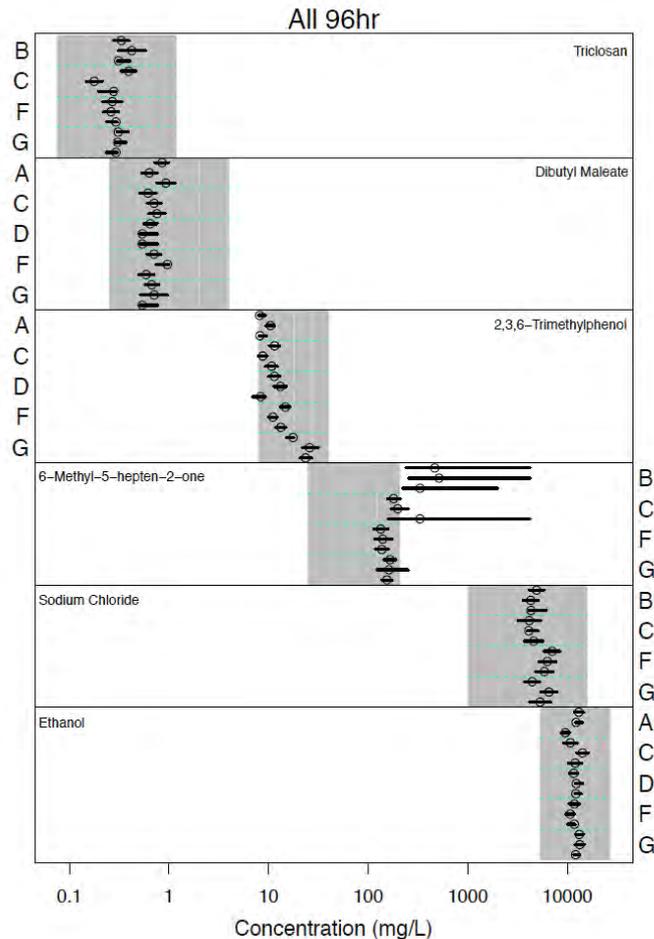


Abb. 2: Toxizität von 6 Testsubstanzen in Phase 1 der OECD-Validierung des Fischembryotests

Das Ziel von Phase 2 der OECD-Validierung des FET bestand darin, die Intra- und Interlaborvarianz des FET an 13 weiteren Substanzen weiter zu validieren (Tab. 5). Die Auswahl der Testsubstanzen erfolgte auf der Basis ihrer Anwendungsbereiche (Chemikalien, Pharmazeutika, Pestizide, Biozide), dem Bereich der Toxizität sowie des dominanten Wirkungsmechanismus. Die Substanzen wurden wiederum in 5 Konzentrationen in mindestens 3 Replikaten in 4 Laboratorien über einen Expositionszeitraum von 96 h gemessen.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse aus Phase 2 die Befunde aus Phase 1: Für 9 Substanzen lagen die Variationskoeffizienten der LC_{50} -Werte unter 30 %, und nur für die sehr toxischen Verbindungen (steile Dosis-Wirkungs-Kurve!) Merquat 100, Methylquecksilber und Kupfersulfat überschritten die CV 30 %. Prochloraz musste nahe seiner Löslichkeitsgrenze getestet werden, so dass auch hier aus substanztechnischen Gründen höhere Varianzen auftraten. Für die Polymere (Merquat, Luviquat) wirkte das Chorion wie erwartet als Barriere, so dass die Toxizität erst nach Schlupf – jedoch innerhalb der Expositionsdauer von 96 h – dokumentiert werden konnte.

Es war nicht möglich, eine Korrelation z.B. zwischen Expositionszeit und Kategorien chemischer Verbindungen herzustellen. Die statistische Analyse belegt, dass eine Zahl von 20 Embryonen pro Konzentration eine geringfügig bessere statistische Power der Befunde ermöglicht als 10 Embryonen. Insgesamt ist die Prädiktionskraft der Befunde aus dem FET für die akute Toxizität im Fisch als sehr hoch einzustufen.

Tab. 6: Ergebnisse des Heidelberger Labors im Rahmen der Untersuchungen in Phase 2 der OECD-Validierung des Fischtestes

Substance	CAS	MW	Log K _{ow}	Usage	Classification	Mode of Action	Test concentrations (Results of range finders from Uni HD)		
							LC ₅₀ 48 h	LC ₅₀ 96 h	
Dimethylsulfoxide	67-68-5	78.13	-1,35	industrial	neutral organics	narcotic, detergent, solvent, penetrates membranes	10 - 17 - 28.9 - 49.13 - 83.521 g/L	35.99 ± 1.05 g/L	35.99 ± 1.05 g/L
Triethylene glycol	112-27-6	150.18	-1,75	industrial	neutral organics	dehydrating agent, contaminated by benzene	20 - 30 - 45 - 67.5 - 101.25 g/L	1.31 ± 0.11 g/L	0.86 ± 0.02 g/L
Carbamazepine	298-46-4	236.28	2,45	pharmaceutical	amide, substituted urea	blocker of sodium channel	54.7 - 76.5 - 107.1 - 150 - 210 mg/L	179.6 ± 4.04 mg/L	164.69 ± 5.62 mg/L
1-Octanol	111-87-5	130.23	3,00	industrial	neutral organics	narcotic, solvent	2.5 - 5 - 10 - 20 - 40 mg/L	18.58 ± 1.01 mg/L	18.58 ± 1.01 mg/L
2,4-Dinitrophenol	51-28-5	184.11	1,67	industrial	phenol, dinitrophenol	specific (uncoupler)	0.625 - 1.25 - 2.5 - 5 - 10 mg/L	5.19 ± 0.17 mg/L	3.89 ± 0.49 mg/L
Malathion	121-75-5	330.4	2,36	pesticide	ester, dithiophosphate	specific (ACHE)	0.5 - 1 - 2 - 4 - 8 mg/L	4.82 ± 0.36 mg/L	3.53 ± 0.23 mg/L
Prochloraz	67747-09-5	376.67	4,10	pesticide	imidazole	endocrine disruptor, cytochrome P450, sterol biosynthesis	0.5 - 1 - 2 - 4 - 8 mg/L	4.55 ± 0.59 mg/L	4.53 ± 0.58 mg/L
Copper(II) sulfate pentahydrate	7758-99-8	249.7	na	pesticide	na	multiple; Ca metabolism, binding to and inhibition of -SH groups, blockade ATP synthesis	0.15 - 0.3 - 0.6 - 1.2 - 2.4 mg/L*	0.83 ± 0.02 mg/L	0.83 ± 0.02 mg/L
4,6-Dinitro- <i>o</i> -cresol	534-52-1	198.14	2,13	pesticide	phenol, dinitrophenol	uncoupler	0.18 - 0.32 - 0.58 - 1.05 - 1.89 mg/L	0.68 ± 0.11 mg/L	0.50 ± 0.07 mg/L
Sodium tetradecylsulfate	1191-50-0	317,44	2,67	industrial	neutral organics	na	0.156 - 0.3125 - 0.625 - 1.25 - 2.5 mg/L*	0.34 ± 0.02 mg/L	0.34 ± 0.02 mg/L
Methyl mercury (II) chloride	115-09-3	251.08	0,41	industrial	neutral organics	multiple; enzyme component	6.25 - 12.5 - 25 - 50 - 100 µg/L	70.54 ± 0.00 µg/L	42.81 ± 6.46 µg/L
Merquat-280	26062-79-3	na	na	industrial	polymer	na	0.1 - 0.2 - 0.4 - 0.8 - 1.6 mg/L	Only lethal after hatching (72 h)	0.53 ± 0.08 mg/L
Luviquat HM 522	95144-24-4	255,74	na	industrial	polymer	na	0.125 - 0.25 - 0.5 - 1 - 2 mg/L	Only lethal after hatching (72 h)	0.83 ± 0.09 mg/L

* Range finders performed by Procter and Gamble

n.a. = not available

2. Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf von Embryonen des Zebrabärblings

Mit Hilfe von Mikrosonden wurde untersucht, ob niedrige Sauerstoffkonzentrationen, wie sie bei der Prüfung von Abwässern und Sedimenten auftreten können, zu einem vorzeitigen, nicht stoffbezogenen Tod von Embryonen des Zebrabärblings führen können. Die Messungen ergaben, dass an der Oberfläche von organisch stark belasteten Sedimenten tatsächlich starke Sauerstoffgradienten auftreten können. Der Sauerstoffbedarf eines Embryos des Zebrabärblings ist jedoch so gering, dass eine Schädigung nur in extremen Ausnahmefällen eintreten wird.

Ruben Strecker 2008 Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf des Zebrabärblings (Danio rerio) im Sedimentkontakttest. Diplomarbeit Universität Heidelberg (Anhang 5).

Strecker, R., Seiler, T.B., Hollert, H., Braunbeck, T. (2011) Oxygen requirements of zebrafish (Danio rerio) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. Comp. Biochem. Physiol. 153 C: 318-327 (Anhang 6).

Aus den Erfahrungen mit dem Fischeitest in der Abwasserprüfung nach DIN-Norm 38415-6 T6 („Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen“) hatten sich Kritikpunkte bezüglich einer mangelhaften Sauerstoffversorgung der Embryonen ergeben: Möglicherweise sei die Mortalität der Embryonen bei der Prüfung stark sauerstoffzehrender Abwässer nicht auf die Toxizität von Wasserinhaltsstoffen, sondern auf die mangelhafte Sauerstoffversorgung in den Kavitäten der 24-Well-Platten zurückzuführen. Die gleiche Problematik tritt z.B. bei der Prüfung von stark organisch belasteten Sedimenten auf. Um dieser Frage nachzugehen, wurden in der Diplomarbeit von Ruben Strecker eingehende Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf verschiedener früher Entwicklungsstadien des Zebrabärblings angestellt und publiziert (Anhänge 1, 2).

Die wichtigsten Befunde der Studie können wie folgt zusammengefasst werden: Unter Verwendung von Mikrosensoren wurden die Sauerstoffbedingungen unmittelbar auf den Testsedimenten untersucht (Abb.3). Diese Sauerstoffkonzentrationen sind für eine normale Entwicklung der Embryonen zu niedrig. Deshalb sollte zunächst ermittelt werden, ob sich die Sauerstoffversorgung der Eier durch ein leichtes Schütteln der Testplatten während der Exposition auf einem Orbital- oder einem Taumelschüttler verbessern ließ. Auf beiden Schüttlertypen konnten die bei verschiedenen Beispielsedimenten (Hunte und Zenne) zuvor beobachteten Entwicklungsverzögerungen signifikant auf unter 10 % reduziert werden.

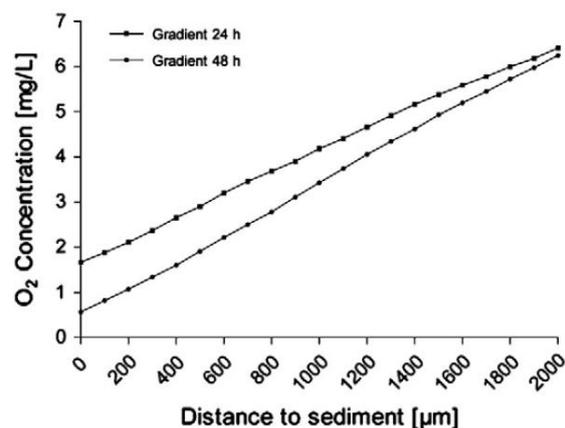


Abb. 3: Sauerstoffgradient in einer Entfernung von 0 bis 2000 µm zu dem Beispielsediment Hunte. Nahezu linearer Anstieg der Sauerstoffkonzentration mit der Entfernung. Messreihen nach 24 bzw. 48 h.

Im zweiten Teil dieser Studie wurden die kritischen Sauerstoffkonzentrationen ermittelt, die notwendig sind, um eine normale Entwicklung der Embryonen des Zebrabärblings gewährleisten zu können.

Ebenso wurden die letalen und subletalen Effekte von Sauerstoffmangelsituationen auf die Entwicklung der Embryonen in den ersten 96 h nach der Befruchtung untersucht. Keine signifikanten Effekte wiesen die Embryonen im Sauerstoffkonzentrationsbereich zwischen 7,15 und 3,33 mg/L auf; Konzentrationen zwischen 3,0 und 2,0 mg/L verursachten geringfügige Entwicklungsverzögerungen jedoch ohne dauerhafte pathologische Folgen. Zwischen 2,0 und 0,88 mg/L wurde ein sauerstoffabhängiger Anstieg pathologischer Symptome beobachtet; es handelte sich dabei um pericardiale Ödeme (≤ 1.64 mg/L), Schwanzdeformationen und sehr starke Entwicklungsverzögerungen (≤ 1.47 mg/L). Sauerstoffwerte unterhalb von 0,88 mg/L waren 100 % letal. Embryonen, die Sauerstoffkonzentrationen ≤ 0.3 mg/L exponiert waren, koagulierten innerhalb von 24 - 48 h. Eine weitere Behandlung der getesteten Embryonen unter normoxischen Bedingungen (96 h Belastung + 96 h Normoxie) zeigte, dass sich alle Embryonen bis zu einer Sauerstoffkonzentration von 1,47 mg/L erholen; lediglich 20 % der Embryonen wiesen eine Skoliose des Schwanzes auf.

Über Messungen mit Mikrosonden wurde der Sauerstoffverbrauch einzelner Embryonen gemessen (Abb. 2) – dies im Gegensatz zu früheren Studien, in denen mehrere Eier gepoolt wurden und aus dem Gesamtverbrauch der Verbrauch der einzelnen Embryonen ermittelt wurde. Im Gegensatz zu Studien mit gepoolten Embryonen ergab die Präzisionsmessung an einzelnen Embryonen, dass der Sauerstoffbedarf früher Entwicklungsstadien deutlich geringer ist als bisher angenommen wurde. Der gesamte Sauerstoffverbrauch (unter Normalbedingungen) der Embryonen beträgt 0,674 μmol in den ersten 72 h nach der Befruchtung (Abb. 4). Der Verbrauch steigt vom ersten zum zweiten Tag von 0,165 auf 0,244 μmol an und erreicht am dritten Tag den höchsten Wert von 0,265 μmol . Eine Schädigung der Embryonen durch mangelhafte Sauerstoffversorgung bei der Prüfung von Abwässern und Sedimenten kann also erst bei sehr geringen Sauerstoffspannungen auftreten.

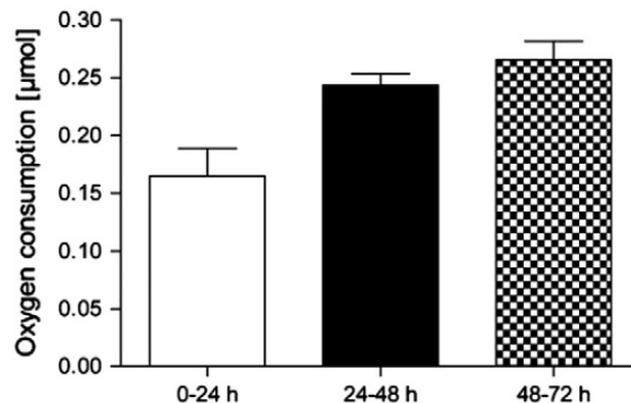


Abb. 4: Sauerstoffverbrauch eines einzelnen Embryos des Zebrafischblings während der ersten 3 Tage nach der Befruchtung.

Die Untersuchung des Sauerstoffbedarfs beantwortet Kommentare aus der 2006 Kommentierung der OECD Mitgliedsstaaten des 1. OECD Prüfrichtlinienentwurfs. Ein Schütteln der 24-Wellplatten ist danach nicht notwendig. Der Vorschlag ist, Sauerstoff am Beginn und am Ende des Tests in der/den Kontrolle/n und der höchsten Testkonzentration zu messen, wobei die Sauerstoffsättigung am Beginn des Tests 80% betragen muss (Akzeptanzkriterium).

3. Untersuchungen zur Toxizität von hoch konzentrierten Salzlösungen auf Embryonen des Zebraäbblings

Im Rahmen der Dissertation von Kirsten Henn wurde unter anderem Kaliumchlorid (KCl) als ein bekannter Ausreißer (d.h. signifikante Unterschiede in der Toxizität gegenüber Embryonen und Adulten des Zebraäbblings) im Vergleich zu anderen Salzen (K_2SO_4 , $KHCO_3$, NaCl, Na_2SO_4 , and $NaHCO_3$) im 48-h sowie 96-h Fischembryotest untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass KCl nur im 48 h- Fischembryotest aus dem Rahmen fällt; für alle anderen untersuchten Salze stimmen die Befunde aus dem Fischembryotest mit jenen aus den akuten Fischtest überein. Eine Verlängerung der Expositionszeit führt auch für KCl zu einer ähnlichen Toxizität wie im Experiment mit adulten Zebraäbblingen. Als Erklärung wird eine unterschiedliche Regulation bzw. eine unterschiedliche Lokalisation der Ionen-Transporter beim Embryo und beim adultem Fisch diskutiert.

Wendler, K., Strecker, R., Braunbeck, T. (2011) Toxicity of anionic salts in the fish embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*). Manuscript submitted to *Comp. Biochem. Physiol.* (Anhang 7).

Ein weiterer Kritikpunkt am Fischembryotest mit dem Zebraäbbling betraf den Mangel an Daten zur Wirkung von hohen Salzkonzentrationen, wie sie bei manchen Abwässern beobachtet werden können. Daher wurde im Rahmen der Dissertation von Kirsten Henn Kaliumchlorid (KCl) als ein bekannter Ausreißer (d.h. signifikante Unterschiede in der Toxizität gegenüber Embryonen und Adulten des Zebraäbblings) im Vergleich zu anderen Salzen (K_2SO_4 , $KHCO_3$, NaCl, Na_2SO_4 , and $NaHCO_3$) im 48-h sowie 96-h Fischembryotest untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass KCl nur im 48 h- Fischembryotest aus dem Rahmen fällt (Tab. 6); für die anderen Kaliumsalze tritt das Phänomen nicht auf. Für die Natriumsalze stimmen die Ergebnisse aus dem Fischembryotest mit jenem aus dem Fischtest sehr gut überein (Abb. 5). Eine Verlängerung der Expositionszeit führt auch für KCl zu einer ähnlichen Toxizität wie im Experiment mit adulten Zebraäbblingen (Tab. 6).

Tab. 6: Toxizität verschiedener anorganischer Salze auf den Embryo des Zebraäbblings (*Danio rerio*).

	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) Embryotoxizität				OECD EPA Mittel ¹⁾	<i>Pimephales promelas</i> (Mount et al. 1997)	
	48-h FET	96-h FET	Eleuthero-embryo	Dechorionierte Embryonen		Larve	
	Alter Exposition	48hpf 48h	120hpf 120h	120hpf 48h	120hpf 96h	Adult 96h	Larve 48h 96h
$KHCO_3$	11.6	1.38	1.34	1.30 ²⁾	–	0.82	< 0.51
K_2SO_4	23.7	0.89	1.0	0.90	2.12	0.86	0.68
KCl	14.95	0.85	1.12	0.94	1.38	0.91	0.88
$NaHCO_3$	8.83	2.41	2.54	–	8.61	2.5	0.85
NaCl	7.09	6.06	12.14	–	7.95	6.51	6.39
Na_2SO_4	19.35	12.35	15.6	–	10.08	> 7.96	7.96

¹⁾ Mittelwert aller verfügbaren 96h LC₅₀ Daten für die 5 OECD Schlüssespezies *Danio rerio*, *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*, und *Oryzias latipes* aus der ECOTOX Datenbank (EPA, 2002)

²⁾ Embryoalter: 144hpf, Exposition: 120h; n.r.: LC₅₀ nicht erreicht

Für die Überarbeitung des OECD Prüfrichtlinienentwurfs wurde beschlossen, dass der Fischembryotest auf 96 h Exposition nach Befruchtung verlängert wird, wodurch auch Kaliumchlorid eine Toxizität wie im akuten Fischttest zeigt.

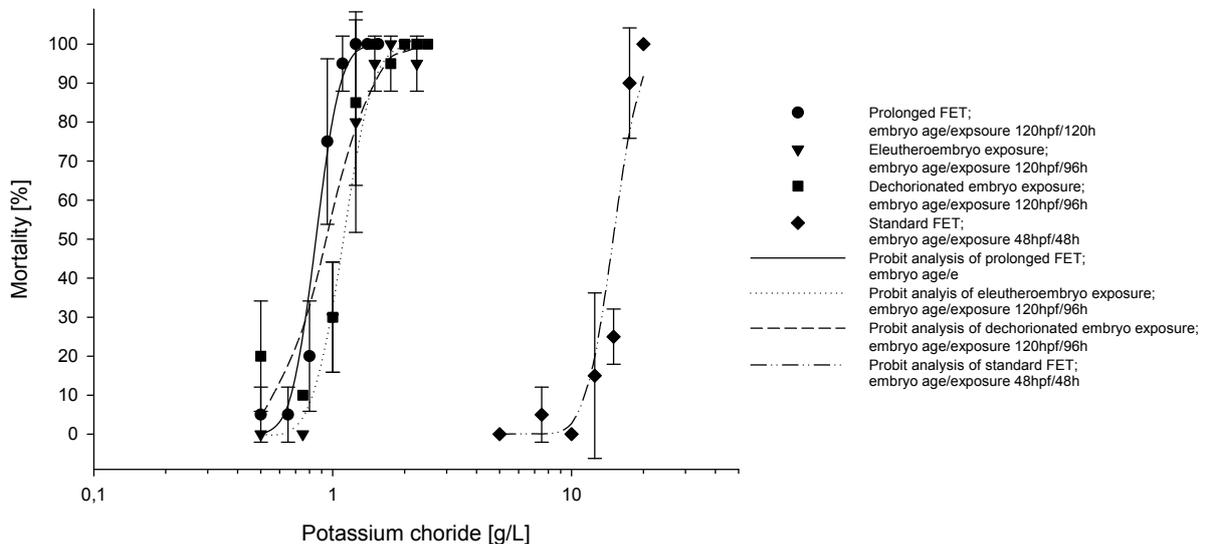


Abb. 5a: Vergleich der Mortalitäten nach 120 h Belastung mit KCl in nicht-dechorionierten Embryonen (●), nach 48 h Belastung mit KCl in Eleutheroembryonen, die ab einem Alter von 72 h exponiert wurden (Gesamalter: 120 h; ▼), nach 96 h KCl-Belastung von dechorionierten Embryonen, die im Alter von 24 h dechorionierte wurden (Gesamalter: 120 h; ■) sowie nach 48 h KCl-Belastung im Standard-Fischembryotest (◆).

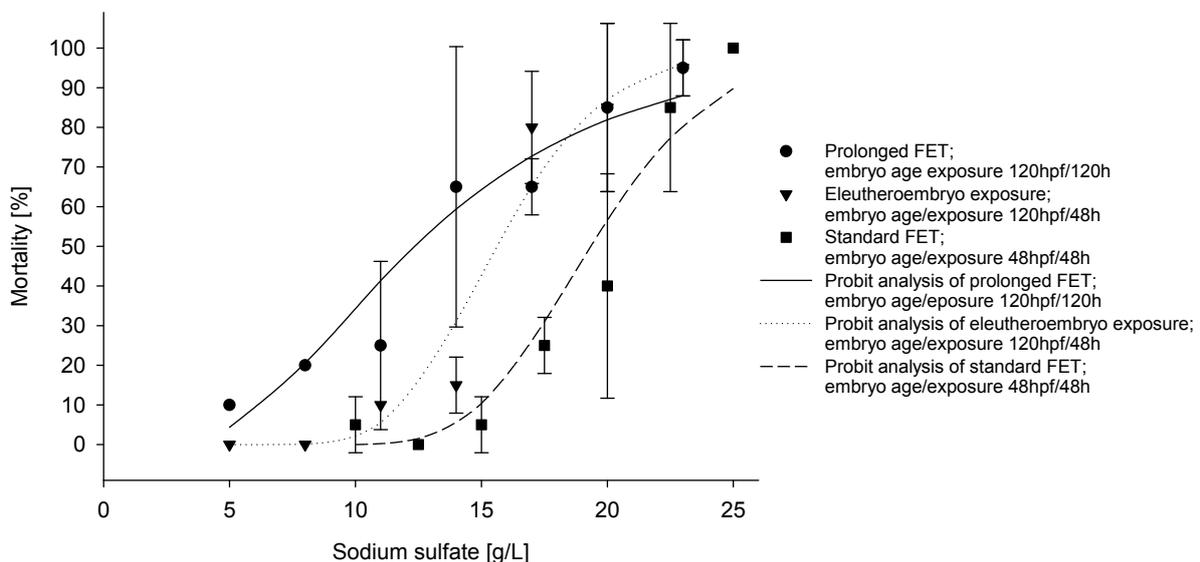


Abb. 5b: Vergleich der Mortalitäten nach 120 h Belastung mit NaSO₄ in nicht-dechorionierten Embryonen (●), nach 48 h Belastung mit NaSO₄ in Eleutheroembryonen, die ab einem Alter von 72 h exponiert wurden (Gesamalter: 120 h; ▼) sowie nach 48 h KCl-Belastung im Standard-Fischembryotest (■).

4. Ab wann ist ein Versuch mit Fischembryonen ein Tierversuch gemäß der neuen EU Richtlinie 2010/63?

Weltweit ist der Zebrafisch mittlerweile ein wichtiges Modell in der biomedizinischen Forschung und in der (Öko-)Toxikologie. Insbesondere der Embryo des Zebrafisches erfährt zunehmende Beachtung, da er in der Regel als Ersatzmethode zum Tierexperiment mit intakten (adulten) Zebrafischen angesehen wird. Insbesondere komplexere Endpunkte erfordern jedoch die Exposition bis ins Stadium der geschlüpften Eleutheroembryonen ohne externe Nahrungsaufnahme. Nach der neuen EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz von Tieren im Einsatz für wissenschaftliche Experimente wird nun für den Geltungsbereich der europäischen Union einheitlich festgelegt, dass frühe, nicht „freilebende“ Entwicklungsstadien von Tieren als nicht geschützt eingestuft werden. Als solche Entwicklungsstadien von Fischen werden im Sinne der Richtlinie alle Stadien aufgefasst, die sich nicht unabhängig ernähren. Damit sind Eleutheroembryonen, also geschlüpfte, jedoch noch nicht aktiv extern fressende Embryonen des Zebrafisches als nicht geschützte Stadien aufzufassen. Die EU-Richtlinie legt dabei die Mindestanforderungen an den Tierschutz für die EU Mitgliedsstaaten fest und strengere Regelungen in der nationalen Umsetzung sind möglich. Die Mitgliedsstaaten haben 2 Jahre Zeit (bis 09/2012) die Richtlinie in nationales Recht umzusetzen. Trotz der Definition in der EU Richtlinie existieren unterschiedliche Auffassungen in der Interpretation des Kriteriums der Nahrungsaufnahme. In einem Positionspapier wurde eine wissenschaftlich fundierte Begründung für die Definition des Zeitpunkts der externen Nahrungsaufnahme gesucht. Die Analyse ergibt, dass auf der Basis von Dotternutzung, aktiver Nahrungsaufnahme und Schwimmverhalten für den Zebrafisch erst ab 120 Stunden nach Befruchtung von einer aktiven externen Nahrungsaufnahme und -nutzung ausgegangen werden kann. Experimente mit dem Zebrafisch fallen daher bis zu einem Alter von 120 Stunden (5 Tagen) nicht unter die Bestimmungen der europäischen Tierschutzrichtlinie und könnten daher bis zu diesem Alter nicht als Tierversuche eingestuft werden.

*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. *Reprod. Toxicol.* 33(2):245-253 (Anhang 8).*

Weltweit ist der Zebrafisch mittlerweile ein wichtiges Modell in der biomedizinischen Forschung und in der (Öko-)Toxikologie. Insbesondere der Embryo des Zebrafisches erfährt zunehmende Beachtung, da er in der Regel als Ersatzmethode zum Tierexperiment mit intakten (adulten) Zebrafischen angesehen wird. Der Embryo des Zebrafisches erlaubt unter anderem aufgrund seiner Transparenz die Erfassung zahlreicher Endpunkte für die Bestimmung von akuter Toxizität, die Dokumentation teratogener (also subletaler) Prozesse und die Analyse komplexer physiologischer und genetischer Prozesse. Insbesondere die komplexeren Endpunkte erfordern jedoch die Exposition der Embryonen bis hinein ins Stadium der Eleutheroembryonen, also Stadien, in denen die Embryonen bereits geschlüpft sind, aber noch keine externe Nahrungsaufnahme zeigen. Insbesondere in Deutschland laufen seit längerer Zeit Diskussionen, bis zu welchem Stadium ein Zebrafisch als nicht vom Gesetz geschützt einzustufen ist, d.h., bis wann ein Fischembryotest als Alternativexperiment einzustufen ist. Nach der neuen EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz von Tieren im Einsatz für wissenschaftliche Experimente wird nun für den Geltungsbereich der europäischen Union einheitlich festgelegt, dass frühe (nicht „freilebende“) Entwicklungsstadien von Tieren als nicht geschützt eingestuft werden und daher nicht in den Geltungsbereich der europäischen Tierschutzrichtlinie fallen. Als frühe,

nicht freilebende Entwicklungsstadien von Fischen werden im Sinne der Richtlinie alle Stadien aufgefasst, die sich nicht unabhängig ernähren. Damit sind Eleutheroembryonen, also geschlüpfte, jedoch noch nicht aktiv extern fressende Embryonen des Zebrafisches als nicht geschützte Stadien aufzufassen. Die EU-Richtlinie legt dabei die Mindestanforderungen an den Tierschutz in wissenschaftlichen Experimenten für die EU Mitgliedsstaaten fest und strengere Regelungen in der nationalen Umsetzung sind möglich. Die Mitgliedsstaaten haben 2 Jahre Zeit (bis 09/2012) die Richtlinie in nationales Recht umzusetzen.

Trotz der eindeutigen Festlegung zu dem Kriterium der Nahrungsaufnahme herrschen bei nationalen und internationalen Behörden immer noch unterschiedliche Auffassungen in der Interpretation dieses Kriteriums. Aus diesem Grund wurde von dem Heidelberg Labor in Kooperation mit Kollegen aus Leipzig, Karlsruhe und Mol (Belgien) sowie mit Kollegen aus dem Umweltbundesamt ein Positionspapier verfasst, in dem Argumente zusammengestellt werden, um zu einer wissenschaftlich begründeten Festlegung des Zeitpunkts zu gelangen, ab dem der Zebrafisch als geschütztes Tier im Sinne der europäischen Tierschutzrichtlinie aufzufassen ist. Die Analyse von eigenen und Literaturdaten ergibt, dass auf der Basis von Befunden zur Nutzung des Dotters, zur Nahrungsaufnahme und zum Schwimmverhalten erst ab 120 Stunden nach der Befruchtung von einer aktiven externen Nahrungsaufnahme und -nutzung ausgegangen werden kann. Experimente mit dem Zebrafisch fallen daher bis zu einem Alter von 120 Stunden (5 Tagen) nicht unter die Bestimmungen der europäischen Tierschutzrichtlinie und sollten daher bis zu diesem Alter nicht als Tierversuche eingestuft werden.

Für die Entwicklung des akuten Fischembryotoxizitätstests bedeutet dies, dass der auf 96 Stunden verlängerte Test innerhalb der Europäischen Union nicht als Tierexperiment im Sinne der neuen EU Richtlinie angesehen wird, solange einzelne Mitgliedstaaten keine strengeren Regelungen festlegen.

5. Untersuchungen zur Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebraäbblings I: Morphologie und Ultrastruktur des Chorions

Das Chorion von Fischen kann potentiell als Barriere die Aufnahme von chemischen Substanzen in den Embryo behindern. Um die morphologischen Grundlagen für eine solche Barrierefunktion zu klären, wurde im Rahmen eine Bachelorarbeit die Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebraäbblings detailliert beschrieben. Sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch erweist sich das Chorion als dreischichtige Struktur, die von zahlreichen Poren durchzogen ist. In späteren Entwicklungsstadien sind die Poren verschlossen; sie dienen vermutlich der Versorgung des Eis mit Dotter. Ultrastrukturell kann nachgewiesen werden, dass die Poren in bestimmten Entwicklungsstadien von Mikrovilli der Follikelzellen durchzogen werden. Die Anzahl der Poren sowie ihr Durchmesser verändern sich mit dem Reifezustand der Eier nicht. Vermutlich unter dem Einfluss von Schlupfenzymen verändert sich die äußere Oberfläche der Eier im Laufe der Eireifung.

Frauke Fedderwitz 2008 Morphologie und Ultrastruktur des Chorions vom Zebraäbbling (Danio rerio). Bachelorarbeit, Universität Heidelberg (Anhang 9).

Das Chorion von Fischen ist die äußerste Barriere des Eies und wirkt so als potentielle Barriere nicht nur gegen das Eindringen von z.B. Parasiten, sondern auch gegen die Aufnahme von chemischen Substanzen in den Embryo. Die potentielle Barrierefunktion des Chorions wird als ein Argument für eine geringere Sensitivität des akuten Fischembryotests im Vergleich zum akuten Fischtest für Substanzen, die das Chorion nicht passieren können, diskutiert. Eine Literaturanalyse zeigte, dass zur Struktur des Chorions des Zebraäbblings wenige Daten vorliegen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit eine detaillierte Beschreibung der Morphologie und Ultrastruktur des Chorions des Eies des Zebraäbblings (*Danio rerio*) erstellt, um morphologische Grundlagen für die Beurteilung der Permeabilität des Chorions zu schaffen. Dafür wurden Eier mittels Licht-, Transmissionselektronen (TEM)- und Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht.

Bereits lichtmikroskopisch können im Chorion des Zebraäbblings Poren sichtbar gemacht werden (Abb. 6, 7). Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) konnte die dreischichtige Struktur des Chorions von befruchteten Eiern mit nicht durchgehenden Poren bestätigt werden (Abb. 8, 9). Die äußere und mittlere Schicht sind relativ dünn, während die tiefe Zona interna den Großteil des Chorions ausmacht. Die Dicke des Chorions verändert sich nach der Befruchtung nicht mehr, jedoch ist das Chorion von unbefruchteten Oozyten im dritten Reifestadium wesentlich dicker. Triton X-100 hatte keinen nachweisbaren Effekt auf das Chorion bezüglich seiner Dicke oder der Poren. Auf der Oberfläche des Chorions befindet sich elektronendichtes Material. Es konnte mit allen drei Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden. Die Herkunft, Zusammensetzung und Funktion dieses Materials ist nicht bekannt. Die Poren des Chorions gehen bei den befruchteten Eiern durch die tiefe Zona interna hindurch, jedoch sind sie in der mittleren und äußeren Schicht verstopft. Es konnte weder eine Veränderung der Porendichte, des Porenabstandes noch der Porentiefe nach der Befruchtung nachgewiesen werden. In unbefruchteten Oocyten (im Reifestadium III) sind die Poren durchgehend und enthalten Mikrovilli. Daher kann vermutet werden, dass die Funktion der Poren vor allem in der Versorgung der Eier während der Eireifung liegt. Die Anzahl der Poren sowie ihr Durchmesser verändern sich mit dem Reifezustand der Eier nicht. Im Rasterelektronenmikroskop zeigt die Chorionoberfläche altersabhängige Veränderungen (Abb. 10).

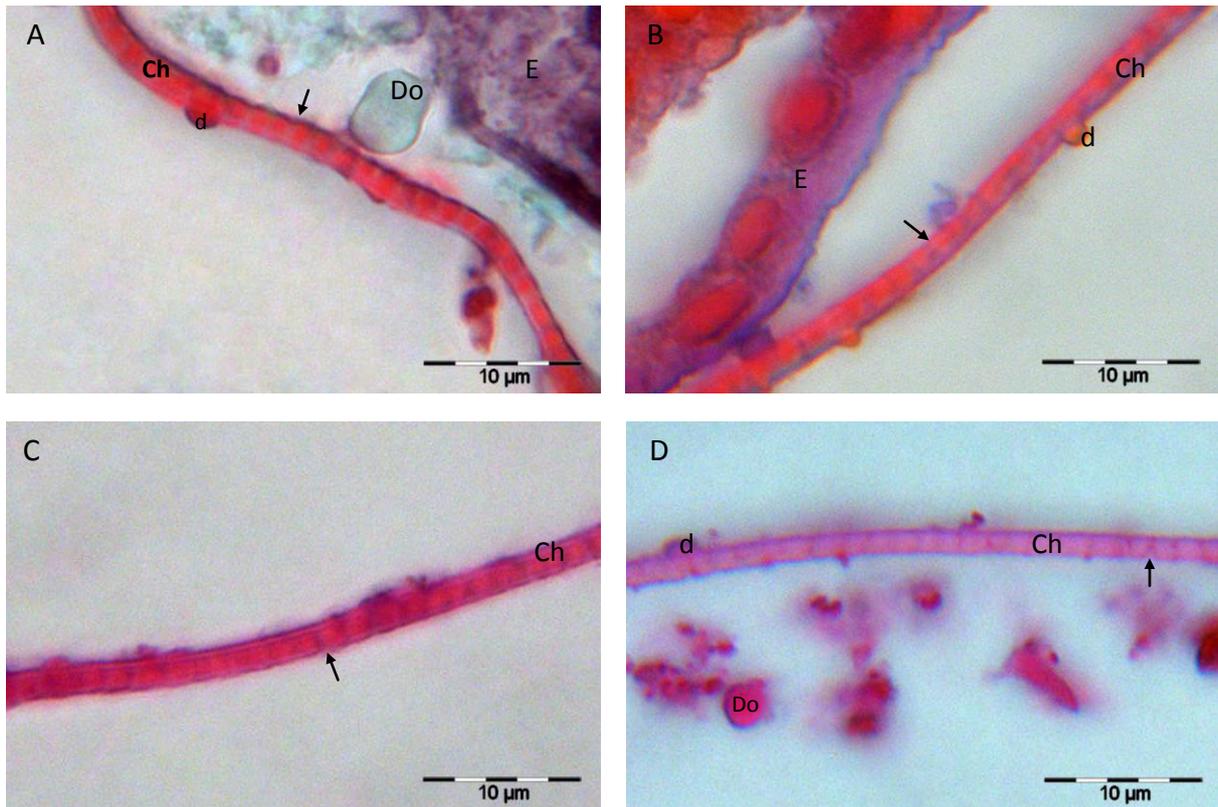


Abb. 6: Lichtmikroskopische Abb. des Chorion: Bei allen vier Färbungen (A: Goldner; B: Azan; C: HAmatoxylin-Eosin (HE); D: Perjodsäure-Schiff (PAS) zeigt das Chorion Poren (Pfeile). d: dichtes Material; Do: Dotter; E: Embryo.

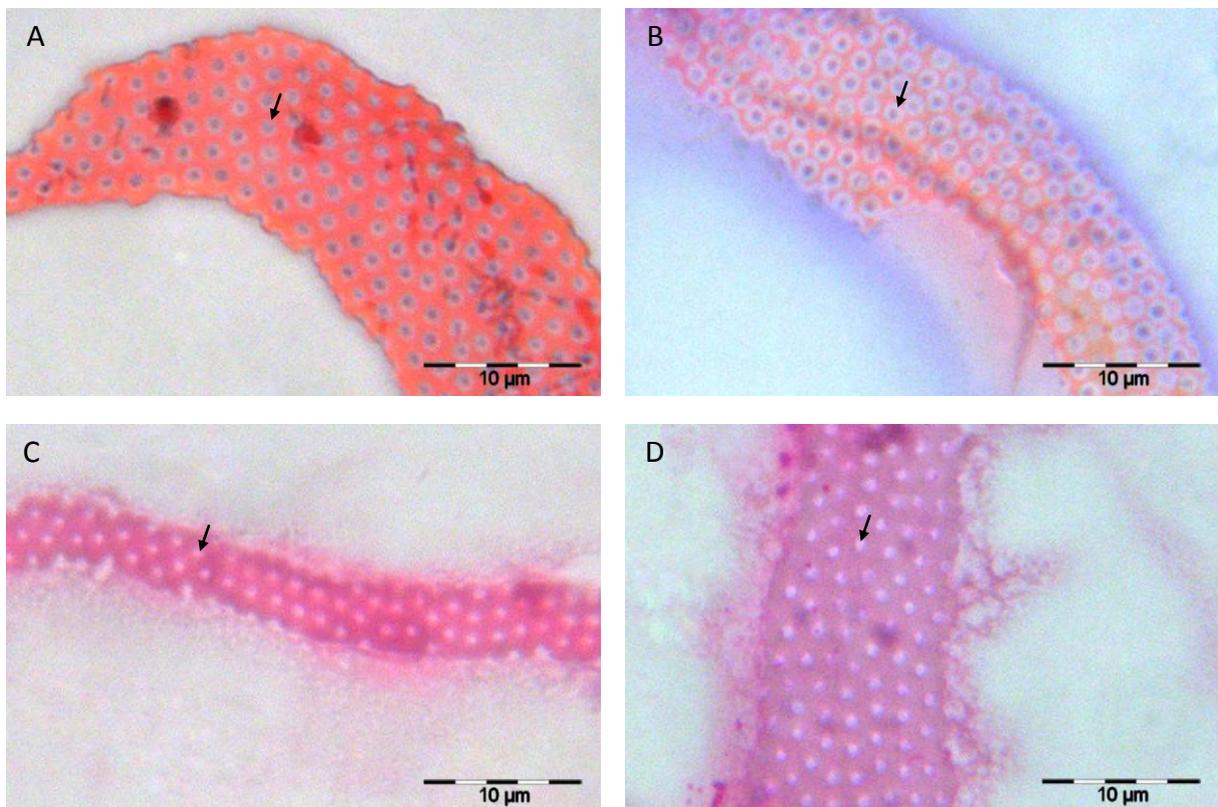


Abb. 7: Aufsicht auf das Chorion von *Danio rerio* 24 h nach der Befruchtung. Bei allen vier Färbungen (A: Goldner; B: Azan; C: Hämatoxylin-Eosin (HE); D: Perjodsäure-Schiff (PAS) zeigt das Chorion Poren (Pfeile).

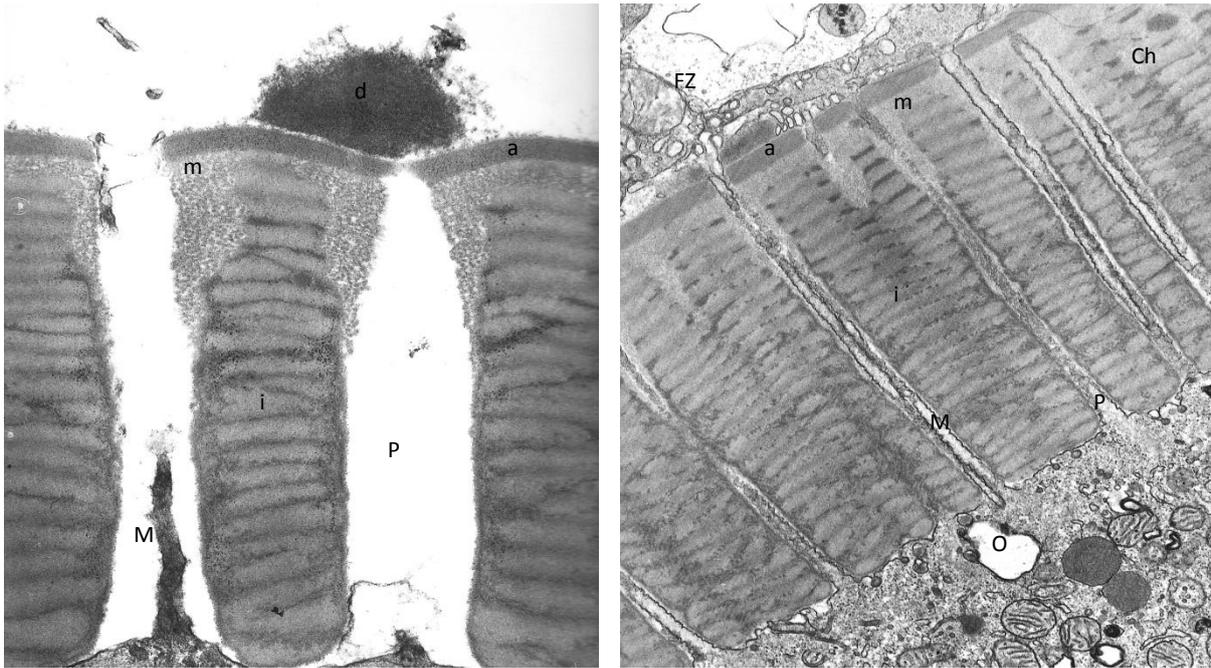


Abb. 8, 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Chorions: Durch das dreischichtige Chorion des Zebraabrlings ziehen sich Poren (P), in denen sich sowohl ausgehend von der Follikelzelle (FZ) als auch von der Oozyte (O) Mikrovilli (M) ziehen. a: äußerste Schicht; m: mittlere Schicht; i: innere Schicht; d: dichtes Material; Vergrößerung: Abb. 8: 20 000x; Abb. 9: 6600x.

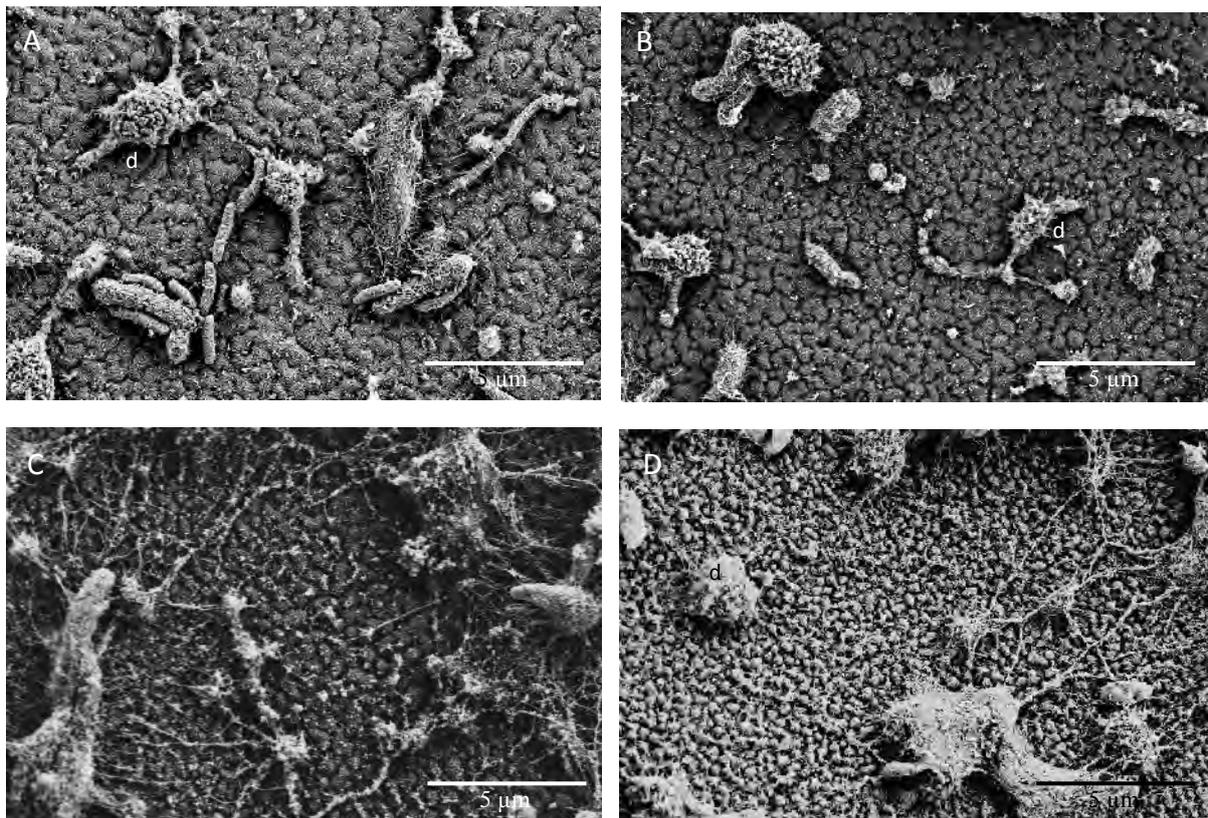


Abb. 10: Außenseite des Chorions von *Danio rerio* im Rasterelektronenmikroskop: 12 h nach der Befruchtung hat die Oberfläche relativ flache Einstülpungen und große flache Erhebungen. Die Struktur der Oberfläche verändert sich mit zunehmendem Alter der Fischeier. 60 h nach der Befruchtung sind auf der Oberfläche kleine kugelförmige Ausstülpungen zu sehen. A: 12 h; B: 24 h; C: 48 h; D: 60 h. d: elektronendichtes Material.

6. Untersuchungen zur Struktur und Ultrastruktur des Chorions des Zebrahärlings II: Die Verteilung von ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen in Ei und Embryo des Zebrahärlings

Um die Barrierefunktion des Chorions zu untersuchen, wurden Eier des Zebrahärlings in fluoreszenzmarkierten Farbstoffen inkubiert, um den Transfer der Substanzen über das Chorion im Fluoreszenz- oder Laserscanning-Rastermikroskop zu verfolgen. Gut wasserlösliche Substanzen wie Rhodamin b und Sulforhodamin b akkumulieren im Dotter des Zebrahärlings; allerdings diffundiert Sulforhodamin b mit seinen geladenen Substituenten erst nach 48 Stunden durch das sich verändernde Chorion. Das kleinste Molekül Fluorescein sammelt sich bereits nach 24 Stunden vermehrt im Blut und Gehirn, während 2,7-Dichlorofluorescein und 5-Carboxy-2,7-dichlorofluorescein das Chorion erst nach 48 Stunden passieren konnten. Fluorescein-markiertes Dextran mit 3 kDa kann das Chorion nicht passieren und sammelt sich in den Poren. Die Aufnahme von Fluorescein über das Chorion wird durch DMSO-Konzentrationen von 1 und 0,1 % gesteigert, während Fluorescein in 0,01 % DMSO das Chorion nicht passieren kann.

Die Barrierefunktion des Chorions wird einerseits durch die Polarität, die Komplexität, aber auch durch den Octanol-Wasser-Koeffizienten, also die Lipophilie der Substanzen beeinflusst. Außerdem setzen höhere DMSO Konzentrationen die Permeabilität des Chorions herab womit eventuell über eine chemische Manipulation ein neuer Ansatz zur Erforschung der Bedeutung des Chorions in Bezug auf die Embryotoxizität gegeben wird.

Britta Kais 2009 The distribution of different fluorescence dyes in the egg and embryo of the zebrafish (Danio rerio). Diplomarbeit, Universität Heidelberg (Anhang 10).

Um das grundsätzliche Verteilungsverhalten von Chemikalien im FET zu beobachten, wurde die Verteilung von 6 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen in den einzelnen Kompartimenten des Fisches (Chorion, Perivitellin-Raum, verschiedene Organe des Embryos) untersucht.

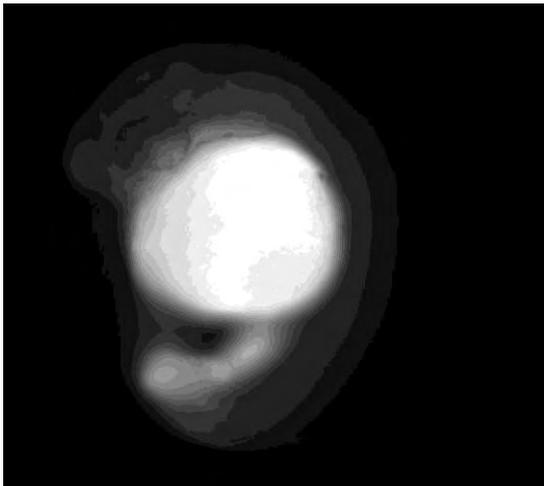


Abb. 11: 24 h nach Befruchtung (hpf) Embryo mit 90 mg/L Rhodamin b belastet, zeigt eine deutliche Akkumulation im Dotter.

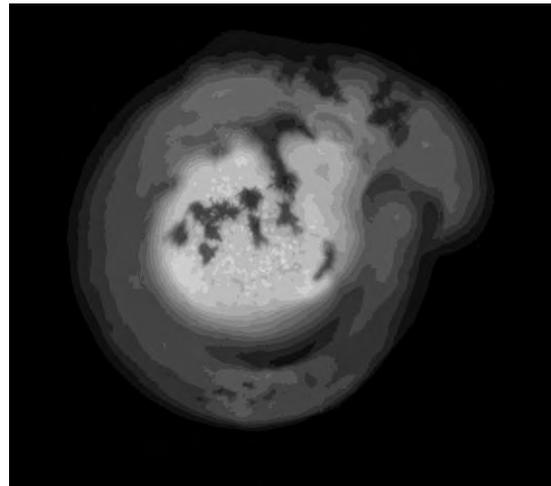


Abb. 12: 48 hpf Embryo mit 90 mg/L Rhodamin b belastet, zeigt neben dem Signal im Dotter eine Ausbreitung über den gesamten Körper.

Zur besseren Beurteilung des Einflusses der Substituenten wurden als Basismoleküle Rhodamin b und Fluorescein verwendet, die jeweils um verschiedene Substituenten erweitert wurden, wobei unterschiedliche Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{ow}$), Molekülgrößen und Ladung berücksichtigt wurden. Getestet wurden Rhodamin b ($\log P_{ow}$ 2,28, MW 479), Sulforhodamin b ($\log P_{ow}$ 1,44, MW 580), Fluorescein ($\log P_{ow}$ 3,4, MW 332), 2,7-Dichlorofluorescein ($\log P_{ow}$ 4,7, MW 401) und 5-Carboxy-2,7-dichlorofluorescein ($\log P_{ow}$ 2,8, MW 445). Die Durchlässigkeit des Chorions aufgrund der Molekülgröße wurde mit Fluorescein-markierten Dextranen von 3 und 40 kDa getestet. Zusätzlich wurde das Aufnahmeverhalten von Fluorescein in unterschiedlichen Dimethylsulfoxid- (DMSO-) Konzentrationen 0,01 %, 0,1 % und 1 %) untersucht.

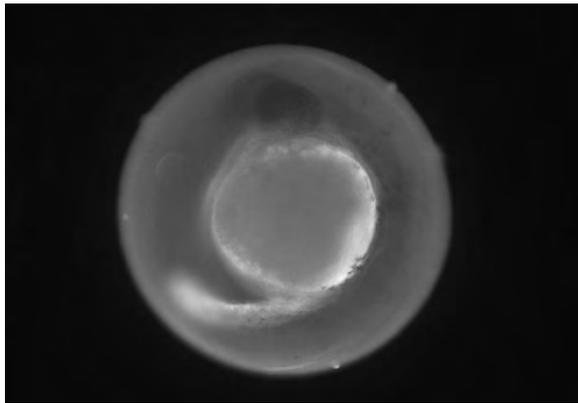


Abb. 13: 24 hpf Embryo mit 100 mg/L Sulforhodamin b: Akkumulation im Dotter und am Chorion.

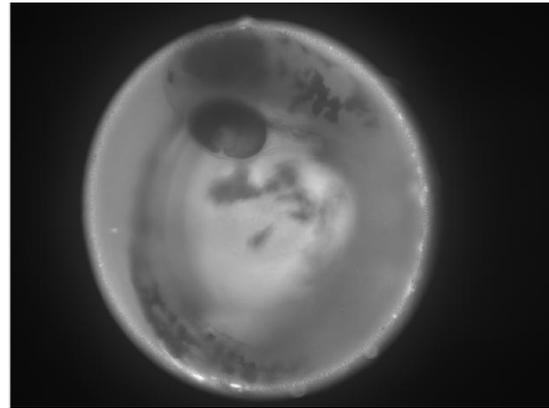


Abb. 14: 48 hpf Embryo mit 100 mg/L Sulforhodamin b: Signal im gesamten Körper des Embryos sowie am Chorion.

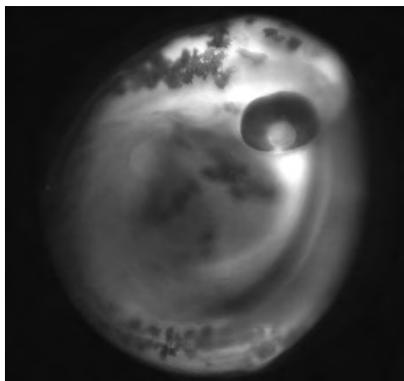


Abb. 15: 48 hpf Embryonen mit 200 mg/L Fluorescein belastet, zeigen ebenfalls ein Signal in der Herz- und Gehirnregion (links, Mitte).

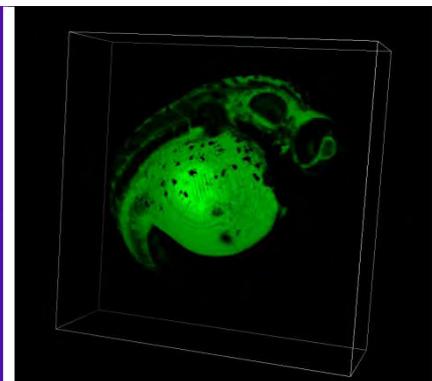
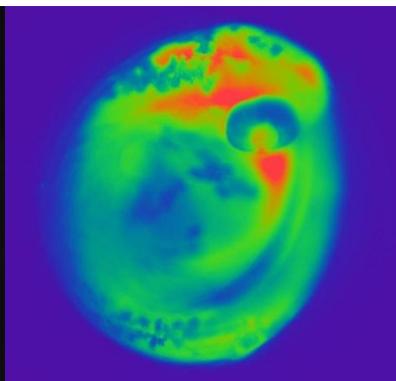


Abb. 16: 48 hpf Embryo mit 100 mg/L Fluorescein belastet zeigt ein deutliches Signal in dem gesamten Embryo, hingegen kein Signal im Chorion.

Gut wasserlösliche Substanzen wie Rhodamin b (Abb. 11, 12) und Sulforhodamin b akkumulieren im Dotter, allerdings diffundierte Sulforhodamin b mit seinen geladenen Substituenten erst nach 48 Stunden durch das sich verändernde Chorion (Abb. 13, 14). Das kleinste Molekül, Fluorescein, sammelte sich bereits nach 24 Stunden vermehrt im Blut und Gehirn (Abb. 15, 16), während 2,7-Dichlorofluorescein (Abb. 17 - 20) und 5-Carboxy-2,7-dichlorofluorescein das Chorion erst nach 48 Stunden passieren konnten. Die Aufnahme von Fluorescein in den Embryo wurde durch DMSO-Konzentrationen von 1 und 0,1 % gesteigert, während Fluorescein in 0,01 % DMSO das Chorion nicht passieren konnte (Abb. 21). Die Fluorescein-markierten Dextran-Moleküle mit 3 und 40 kDa konnten das Chorion nicht passieren, wobei Dextran Fluorescein mit 3 kDa sich in den Poren sammelte.

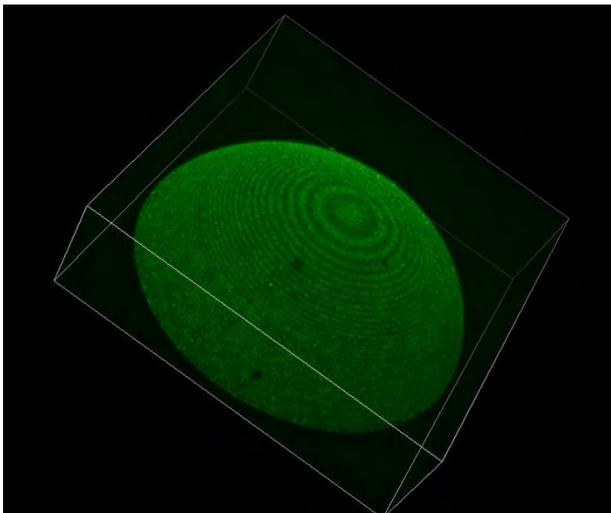


Abb. 17: 24 hpf Embryo belastet mit Dichlorofluorescein 50 mg/L zeigt hauptsächlich ein Signal in dem Chorion und überstrahlt das Signal im Embryo.

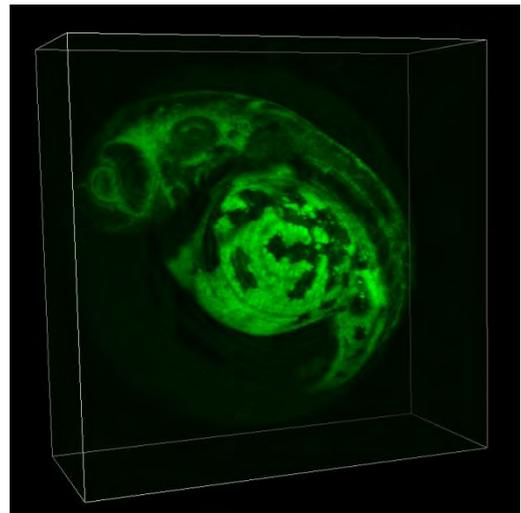


Abb. 18: 48 hpf Embryo belastet mit Dichlorofluorescein 50 mg/L zeigt ein Signal im gesamten Embryo und nur ein sehr schwaches Signal im Chorion.

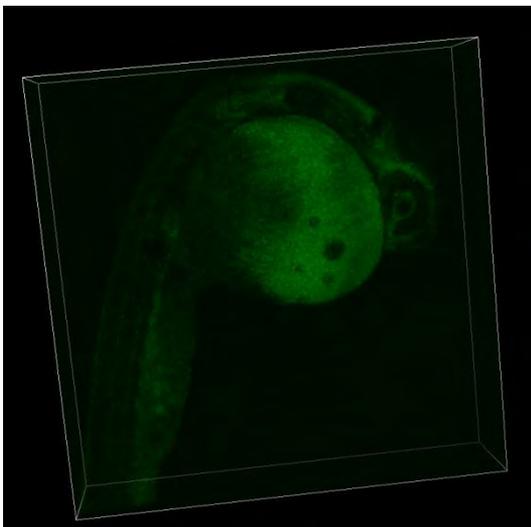


Abb. 19: 24 hpf Embryo belastet mit 2,7-Dichlorofluorescein wurde nach 24 h dechorioniert und zeigt nur ein schwaches Signal.

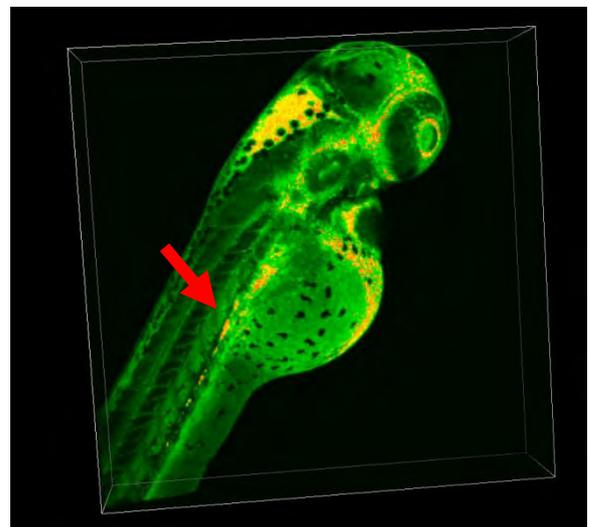


Abb. 20: 48 hpf Embryo belastet mit 2,7-Dichlorofluorescein wurde nach 48 h dechorioniert und zeigt ein starkes Signal im gesamten Embryo, v.a. im Darmlumen (Pfeil)

Die Barrierefunktion des Chorions wird einerseits durch die Polarität, aber auch durch den Octanol-Wasser-Koeffizienten beeinflusst, und dass das Verhältnis zwischen dissoziierter und undissoziierter Form der Substanzen stellt eventuell einen wichtigen Parameter für das Auftreten von Toxizität dar. Außerdem setzen höhere DMSO Konzentrationen die Barriereeigenschaft des Chorions herab und dadurch könnte eventuell ein neuer Ansatz zur Erforschung der Bedeutung des Chorions in Bezug auf die Embryotoxizität gegeben sein.

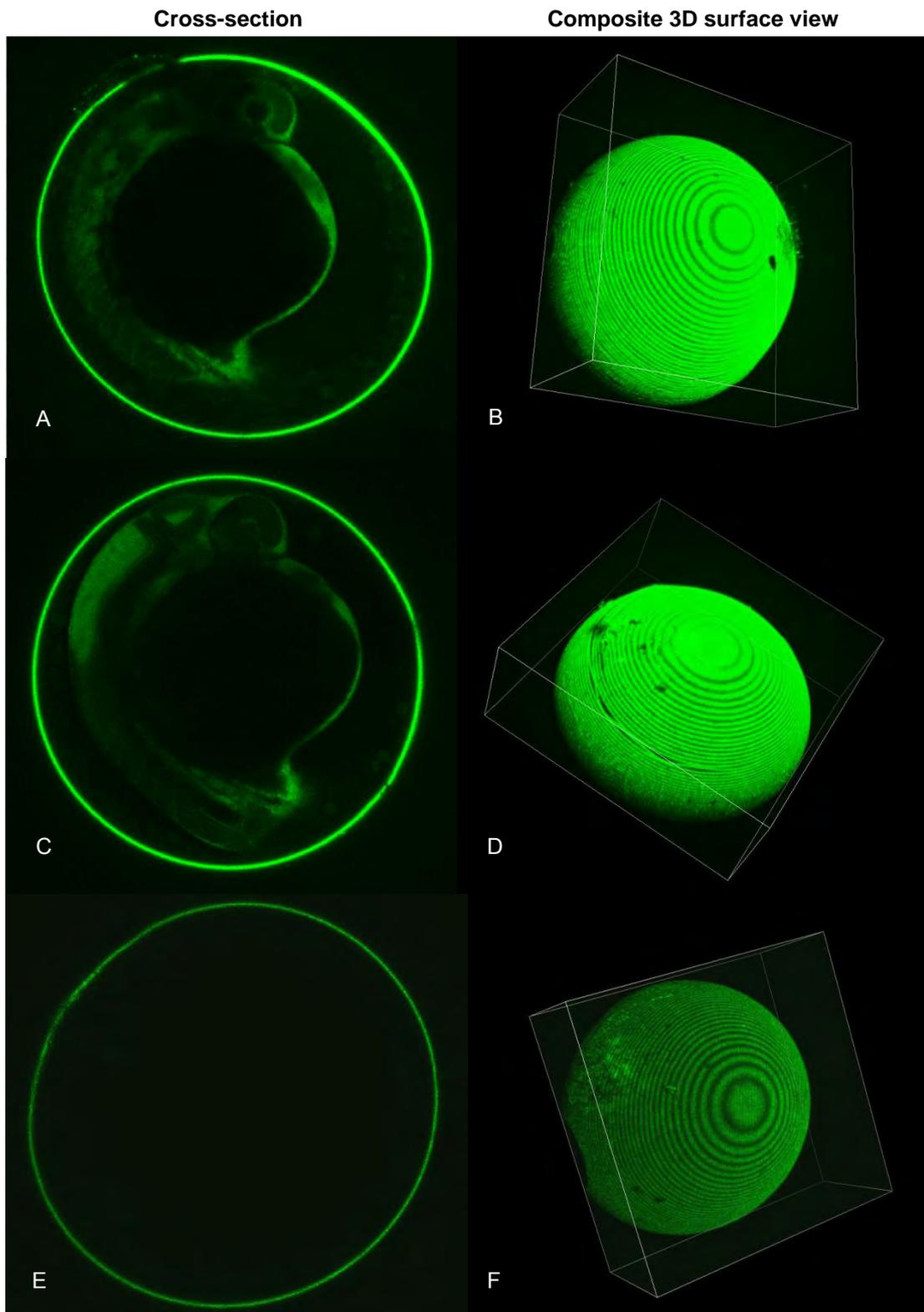


Abb. 21: Querschnitte (A, C, E) vom Ei und 3D-Darstellung der Eioberfläche eines Zebrafährblings (B, D, F). 24 hpf Embryonen belastet mit 100 mg/L Fluorescein in 1 % (A, B), 0,1 % (C, D) und 0,01 % DMSO (E, F). Bei 0,1 und 1 % DMSO diffundierte Fluorescein durch das Chorion und akkumulierte in dem Embryo (A, C). Im Gegensatz dazu passierte bei 0,01 % DMSO Fluorescein das Chorion nicht und es ist kein Signal im Embryo nachzuweisen.

7. Die Dechorionierung von Eiern des Zebraärlings: ein Werkzeug zur Verbesserung des Fischembryotests mit dem Zebraärling?

Es wurde ein Protokoll zur Dechorionierung von Embryonen des Zebraärlings entwickelt. Eine erfolgreiche Dechorionierung des Zebraärlings mit Überlebensraten > 90 % erwies sich erst ab einem Alter von 24 h nach Befruchtung sinnvoll; bei früheren Entwicklungszeitpunkten sinken die Überlebensraten auf 60 - 80 %. Als Beispielsubstanz für die Dechorionierung des Zebraärlings wurde Luviquat HM 552 gewählt, da diese Substanz aufgrund ihres Molekulargewichts von ca. 40.000 D das Chorion nicht passieren kann. Luviquat HM 552 wirkt auf dechorionierte Embryonen jedoch genauso toxisch wie auf frisch geschlüpfte Embryonen sowie Eleutheroembryonen, die erst nach dem Schlupf exponiert wurden. Aufgrund des hohen zeitlichen Aufwands eignet sich die Dechorionierung nicht als Routinemethode. Für den akuten Fischembryotest wurde daher eine Verlängerung des Tests auf nach dem Schlupf (96 Stunden nach Befruchtung) vorgeschlagen, um die Barrierefunktion des Chorions zu adressieren. Die Dechorionierung stellt eine Methode dar, um in kritischen Fällen eine sichere Entscheidung zu treffen, ob eine Substanz auf Embryonen toxisch ist, so dass falsch negative Befunde ausgeschlossen werden können.

Henn, K., Braunbeck, T. 2010 Dechoronation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. 153C: 91-98 (Anhang 11).

Eine der Möglichkeiten, um zu klären, warum in manchen Fällen Embryonen weniger empfindlich auf Schadstoffe reagieren als adulte Fische, besteht darin, die Embryonen zu dechorionieren, also die möglicherweise als Barriere funktionierende Schutzhülle des Chorions experimentell zu entfernen. Es wurde ein Protokoll zur Dechorionierung von Embryonen des Zebraärlings entwickelt. Eine erfolgreiche Dechorionierung des Zebraärlings mit Überlebensraten > 90 % erwies sich erst ab einem Alter von 24 h nach Befruchtung sinnvoll (Abb. 22); vorher ist das Chorion zu weich und die Embryonen zu empfindlich, und die Überlebensraten sinken auf 60 - 80 %.

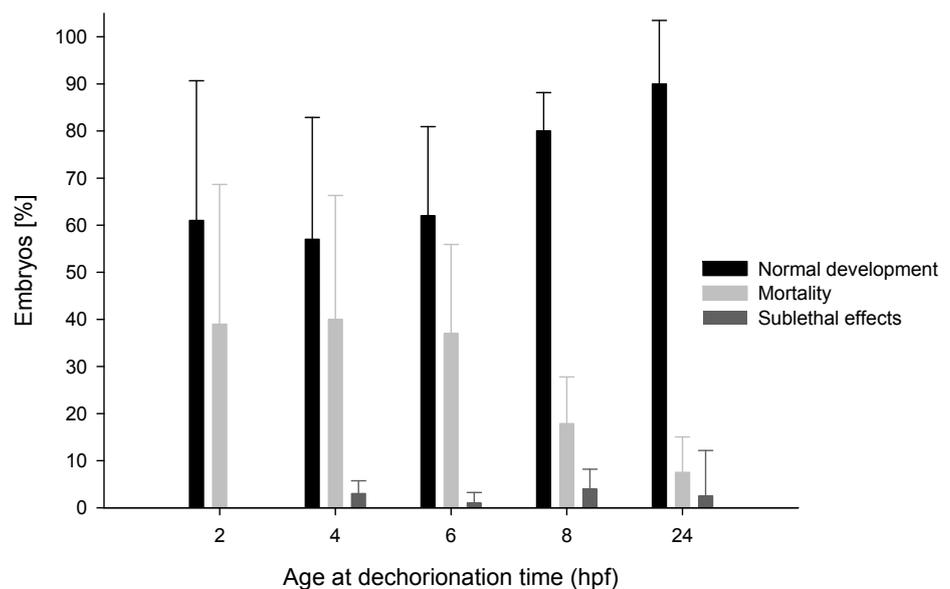


Abb. 22: Abhängigkeit des Auftretens letaler und sublethaler Effekte bei Embryonen des Zebraärlings vom Zeitpunkt der Dechorionierung.

Da 3,4-Dichloranilin (Positivkontrolle) ihre toxische Wirkung beim Zebraärbling vor allem innerhalb der ersten 24 h nach der Befruchtung entfaltet, musste diese für die Dechorionierungsexperimente mit Aceton ersetzt werden.

Als Testsubstanz wurde Luviquat HM 552 im Dechorionierungsexperiment eingesetzt, da diese Substanz aufgrund ihres Molekulargewichts von ca. 40.000 D das Chorion nicht passieren kann. Im Ergebnis wirkt Luviquat HM 552 auf dechorionierte Embryonen genauso toxisch wie auf frisch geschlüpfte Embryonen sowie Eleutheroembryonen, die erst nach dem Schlupf exponiert wurden (Abb.

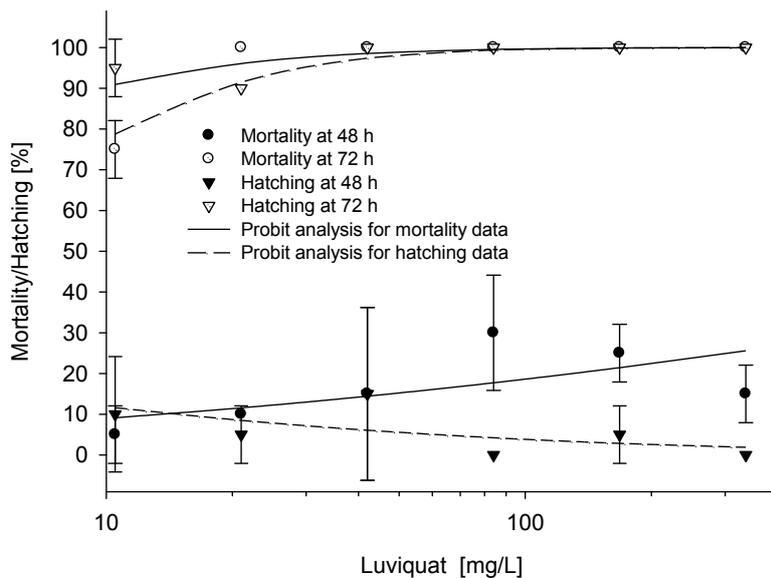
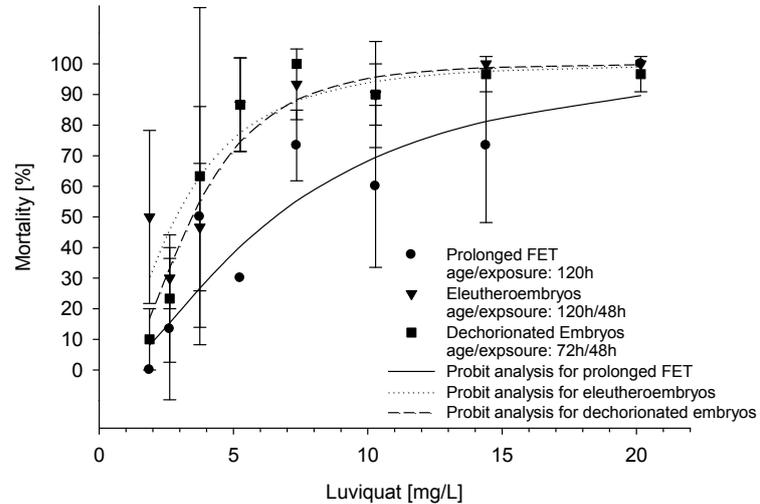


Abb. 22: Mortalität von Embryonen des Zebraärblings (—) nach 48 h (●, <10 % geschlüpft ▼) und 72 h (○, >80% geschlüpft ▽) Exposition gegenüber Luviquat (keine Dechorionierung).

Abb. 23: Mortalität von Embryonen des Zebraärblings nach 120 h Belastung mit Luviquat ohne Dechorionierung (●), nach 48 h Belastung mit Luviquat in Eleutheroembryonen, die ab einem Alter von 72 h exponiert wurden (Gesamalter: 120 h; ▼), und nach 48 h Belastung mit Luviquat nach Dechorionierung nach 24 h (nach Befruchtung; Gesamalter der Embryonen: 72 h; ■).



Aufgrund des hohen zeitlichen Aufwands eignet sich die Dechorionierung nicht als Routinemethode. Für den akuten Fischembryotest wurde daher eine Verlängerung des Tests auf nach dem Schlupf (96 Stunden nach Befruchtung) vorgeschlagen, um die Barrierefunktion des Chorions zu adressieren.

8. Ergänzende Untersuchungen zur Permeabilität des Chorions des Zebrabärblings (*Danio rerio*)

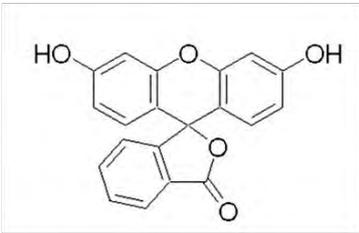
Im November 2011 konnten mit einer Aufstockung der Mittel im Rahmen des hier beschriebenen UBA-Projekts weitere Untersuchungen zur Permeabilität des Chorions des Zebrabärblings initiiert werden, die wie folgt zusammengefasst werden können:

- (1) Gut wasserlösliche, aber nicht dissoziierte Substanzen werden in der Regel problemlos über das Chorion des Zebrabärblings und in den Embryo aufgenommen.
- (2) Substanzen mit geladenen Seitengruppen und einem Molekulargewicht unter 3000 Dalton diffundieren erst nach Erreichen eines Alters von 48 h.
- (3) Substanzen mit einem Molekulargewicht von > 3000 Dalton passieren das Chorion des Zebrabärblings nicht.
- (4) Die Molekülkonfiguration der Substanz beeinflusst die Aufnahme der Substanz über das Chorion des Zebrabärblings.
- (5) DMSO-Konzentrationen > 0,1 % reduzieren die Barrierefunktion des Chorions des Zebrabärblings, sofern diese überhaupt existiert.

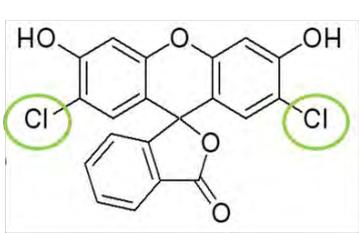
*Kais, B., Keiter, S., Schneider, K.E., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T. (2012) DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion – implications for the fish embryo test (FET). Comp. Biochem. Physiol. eingereicht (Anhang 12).*

In Fortführung der in Kapitel 6 beschriebenen Experimente wurden weitere Untersuchungen zur Permeabilität des Chorions des Zebrabärblings durchgeführt. Zunächst konnte im Vergleich verschieden substituierter Fluoresceine (Abb. 24) bestätigt werden, dass 2,7-Dichlorofluorescein erst nach einer Inkubationsdauer von mindestens 48 h effektiv in den Embryo aufgenommen wird (Abb. 25).

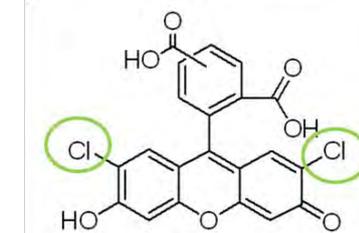
	Fluorescein	2,7-Dichlorofluorescein	5-(6)-Carboxy-2,7-dichlorofluorescein
Log P _{ow}	3.4	4.7	2.8 (calculated)
Water solubility	25 mg/L	2.34 mg/L	Slightly water-soluble



Chemical structure of Fluorescein, showing a xanthene core with two hydroxyl groups at the 2 and 7 positions.



Chemical structure of 2,7-Dichlorofluorescein, showing a xanthene core with two hydroxyl groups at the 2 and 7 positions and two chlorine atoms at the 2 and 7 positions. The chlorine atoms are circled in green.



Chemical structure of 5-(6)-Carboxy-2,7-dichlorofluorescein, showing a xanthene core with two hydroxyl groups at the 2 and 7 positions, two chlorine atoms at the 2 and 7 positions, and a carboxyl group at the 5 position. The chlorine atoms are circled in green.

Abb. 24: Vergleich der chemischen Struktur sowie einiger chemisch-physikalischer Eigenschaften von Fluorescein, 2,7-Dichlorofluorescein und 5-(6)-Carboxy-2,7-dichlorofluorescein.

Nachdem also mit Fluorescein gezeigt werden konnte, dass die Durchlässigkeit des Chorions vor allem von der Konzentration des Lösungsvermittlers DMSO (Dimethylsulfoxid) abhängig ist (vgl. Abb. 21), bestätigte sich diese Beobachtung auch für das wesentlich lipophilere 2,7-Dichlorofluorescein. Bereits bei der Dechorionierung der Embryonen fiel auf, dass das Chorion selbst gefärbt war, also offensichtlich in signifikantem Umfang 2,7-Dichlorofluorescein adsorbiert hatte (Abb. 26). Da bei einem pH-Wert von 7,8 zunächst davon auszugehen ist, dass sowohl Fluorescein als auch 2,7-Dichlorofluorescein in undissoziierter Form über das Chorion aufgenommen wird, zeigt der Vergleich der Aufnahmekinetik von Fluorescein und 2,7-Dichlorofluorescein, dass die Aufnahme von organischen Verbindungen in den Embryo des Zebrafisches nicht notwendigerweise von der Lipophilie abhängig ist. Da beide Substanzen nach 48 h deutlich besser aufgenommen werden, ist vielmehr im Verlauf der Embryonalentwicklung von einer Veränderung der Permeabilität des Chorions selbst auszugehen – und zwar von einer Verbesserung.

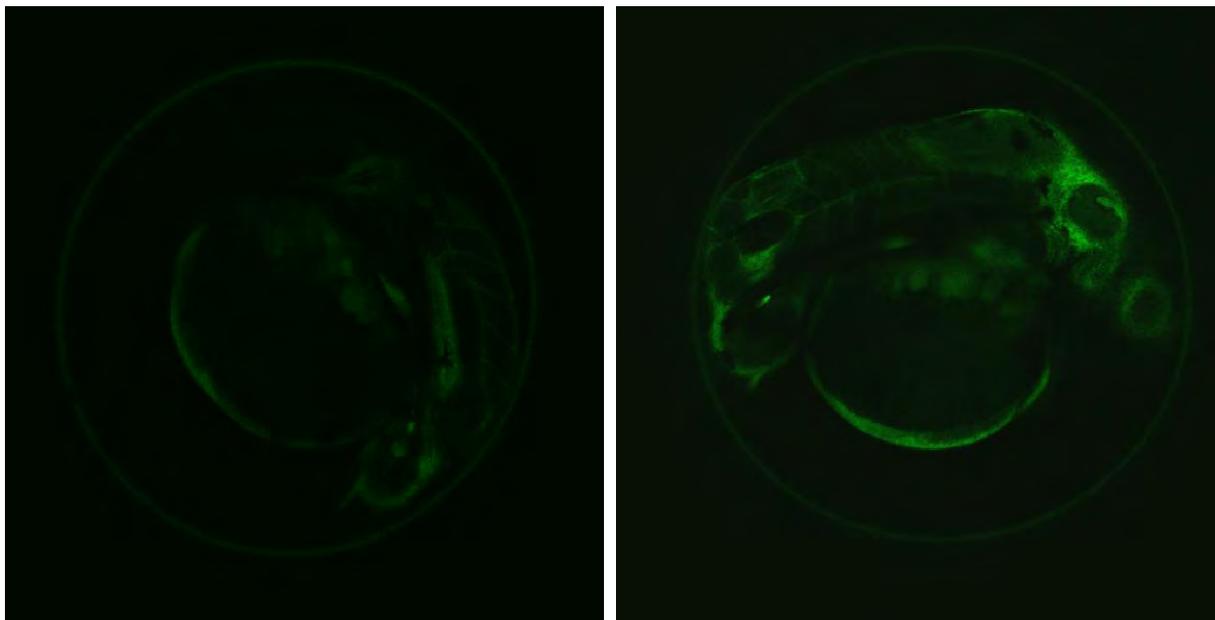


Abb. 25: Während 2,7-Dichlorofluorescein nach 24 h kaum in den Embryo des Zebrafisches (*Danio rerio*) aufgenommen wurde (rechts), konnte nach 48 h ein deutliches Signal vor allem im Gehirn der Embryonen nachgewiesen werden (links).

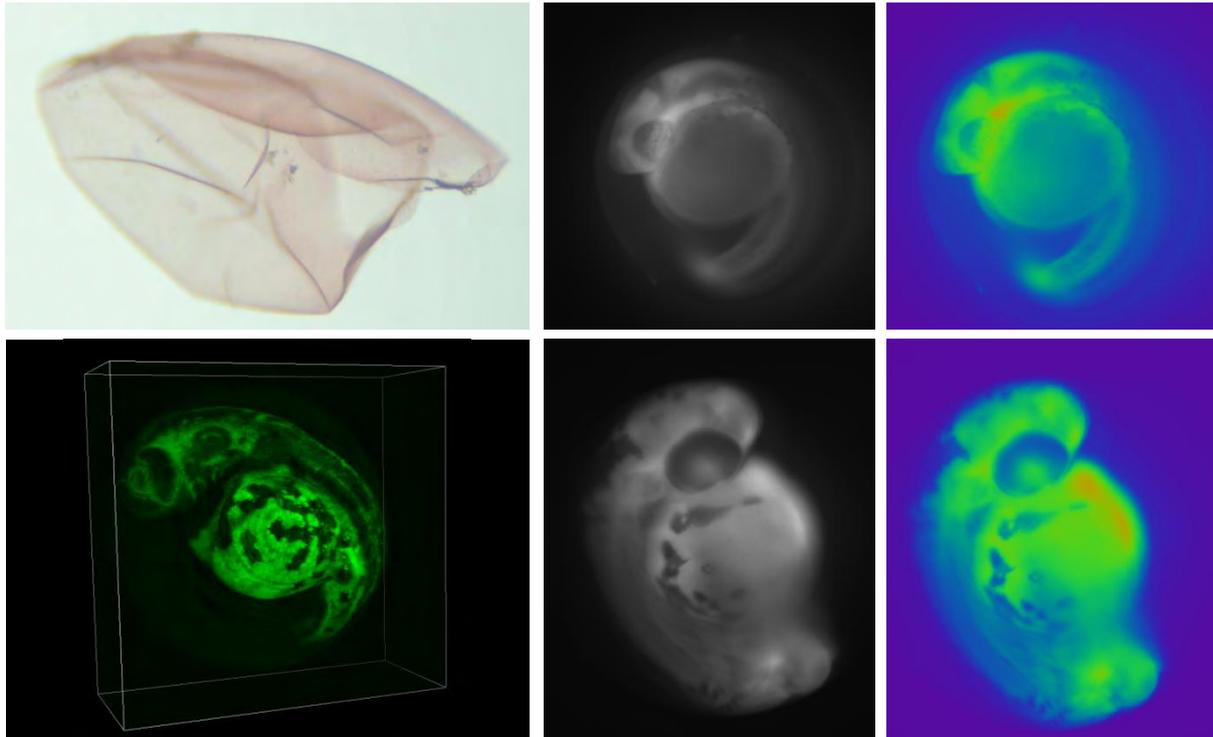


Abb. 26: Trotz zweifacher Chlorierung ($K_{ow} = 4,7$) wird 2,7-Dichlorofluorescein sowohl nach 24 h (oben) als auch nach 48 h (unten) nicht besser von Embryonen des Zebraärbhlings (*Danio rerio*) aufgenommen als Fluorescein (vgl. Abb. 21). Für beide Substanzen wird jedoch deutlich, dass die Substanzen nach 48 h aufgrund einer erhöhten Permeabilität des Chorions stärker in den Embryo aufgenommen werden als nach 24 h. Das Chorion selbst wird durch den Kontakt mit 2,7-Dichlorofluorescein leicht gefärbt (oben links).

Dass die erhöhte Choringängigkeit tatsächlich auf eine Veränderung im Chorion selbst zurückzuführen ist, konnte dadurch gezeigt werden, dass verschieden alte Embryonen über unterschiedliche Zeiträume mit Fluorescein exponiert wurden (Abb. 27): In Abhängig vom Zeitraum der Exposition (von Stunde 0 bis 24 *versus* Stunde 24 bis 48) zeigten die Embryonen erst nach 48 h ein deutliches Signal, das auch nach einer permanenten Exposition nur unwesentlich stärker war.

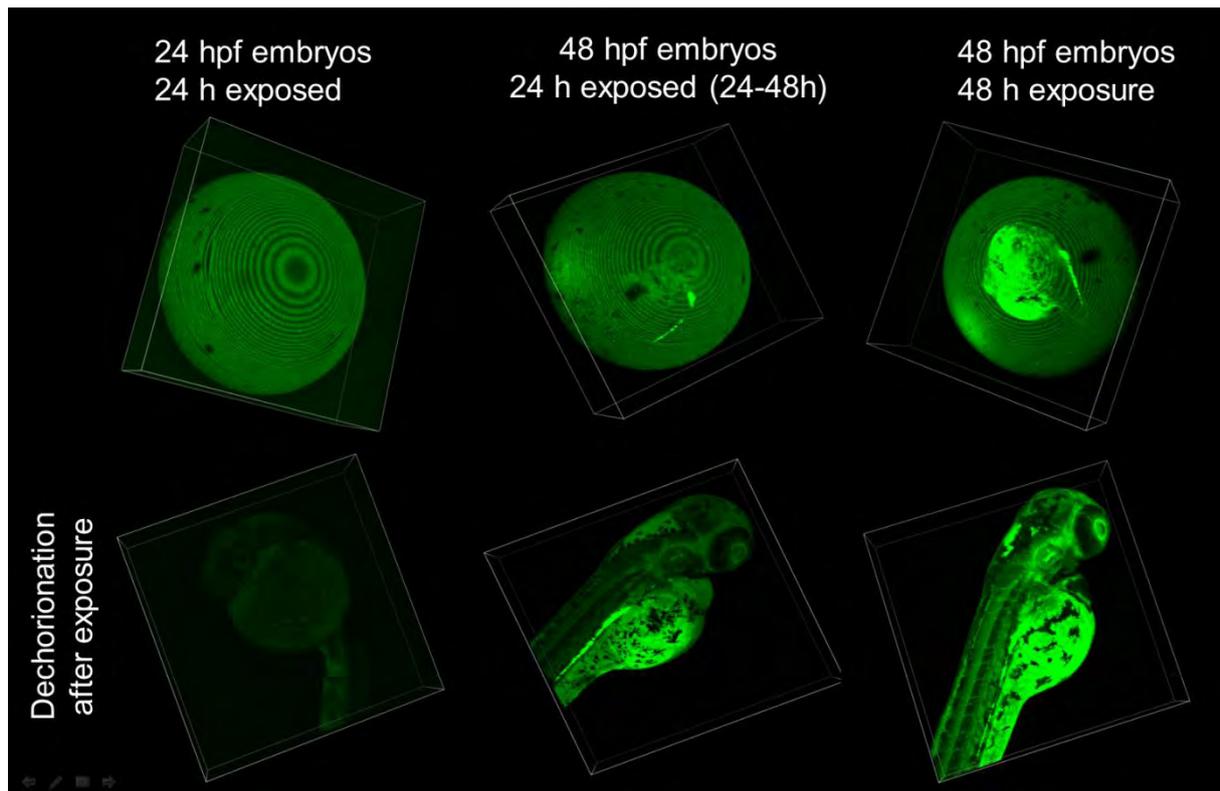


Abb. 27: Abhängig von der Expositionsphase nimmt die Permeabilität des Chorions des Zebrafärblings (*Danio rerio*) für Fluorescein von 24 nach 48 h nach Befruchtung (hpf – hours past fertilisation) deutlich zu; eine permanente Exposition verstärkt das Signal nur unwesentlich (obere Reihe). Dies wird besonders deutlich, wenn die Embryonen unmittelbar nach Abschluss der Belastung dechorioniert werden (untere Reihe).

Die dritte Substanz in diesem Vergleich, 5-(6)-Carboxy-2,7-dichlorofluorescein (Abb. 24) wird wohl aufgrund sterischer Probleme (Form des Moleküls) und ihrer Ladung (Dissoziation des Moleküls) trotz ihres wiederum geringeren log Pow (2,8) nicht über das Chorion aufgenommen (Abb. 28).

Durch weitere Versuchsreihen konnte für den Lösungsvermittler DMSO gezeigt werden, dass die Aufnahme von Fluorescein bereits in 24 h alten Zebrafärblingsembryonen vor allem von der Konzentration von DMSO abhängig ist, wobei das DMSO vor allem den Transfer über das Chorion, weniger aber die Aufnahme in den Embryo erleichtert (Abb. 29). DMSO erhöht also die Bioverfügbarkeit der Stoffe innerhalb des Chorions. Das gleiche Bild ergibt sich bei 48 h alten Embryonen (Abb. 30). DMSO hat keinen Einfluss auf die Verteilung von Fluorescein innerhalb des Embryos (Abb. 31).

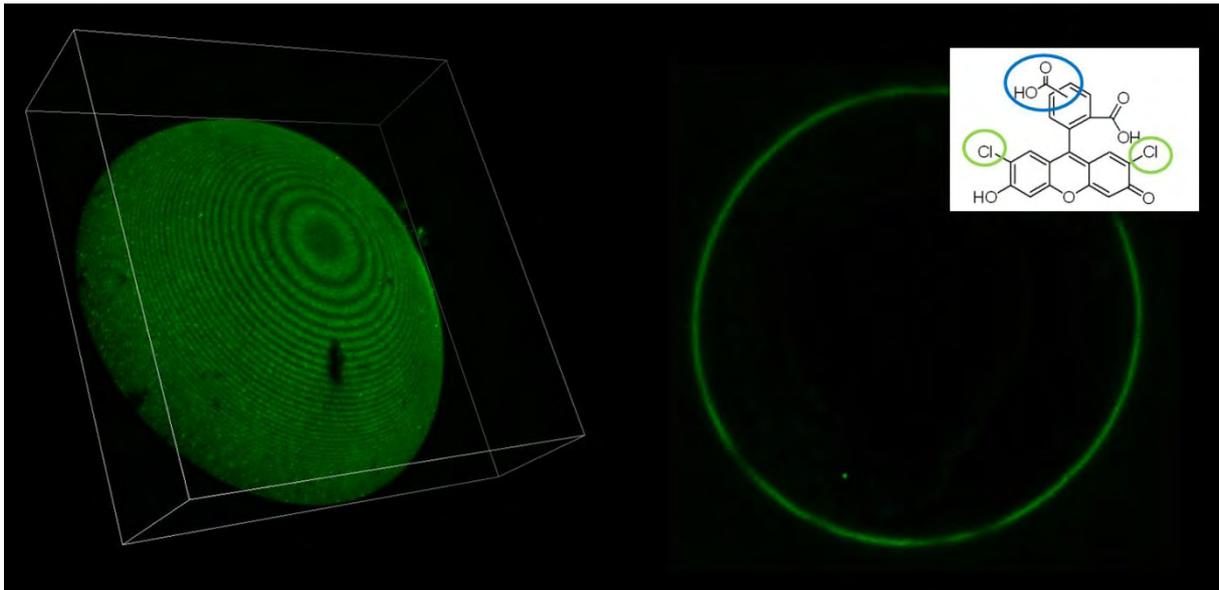


Abb. 28: 5-(6)-Carboxy-2,7-dichlorofluorescein wird aufgrund seiner Ladung im neutralen pH-Bereich und aufgrund sterischer Störungen nicht über das Chorion des Zebrafärblings aufgenommen: Das Signal akkumuliert auf der äußeren Oberfläche des Chorions.

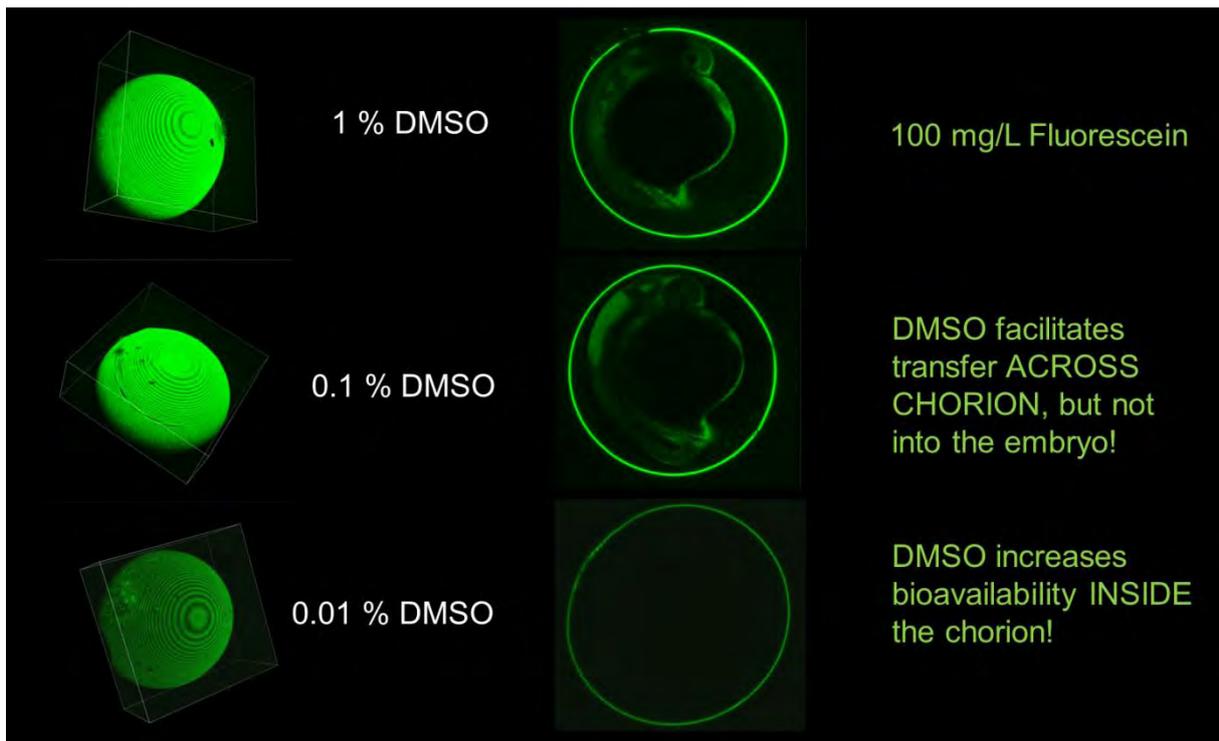


Abb. 29: Der wichtigste Faktor für die Aufnahme von Fluorescein ist die Konzentration des Lösungsvermittlers Dimethylsulfoxid (DMSO). Je höher die DMSO-Konzentration ist desto mehr Fluorescein kann über das Chorion eindringen (links: dreidimensionale Aufsicht; rechts: Schnitt). DMSO beeinflusst allerdings die Gängigkeit des Chorions des Zebrafärblings (*Danio rerio*), nicht jedoch die Aufnahme von Fluorescein in den Embryo selbst.

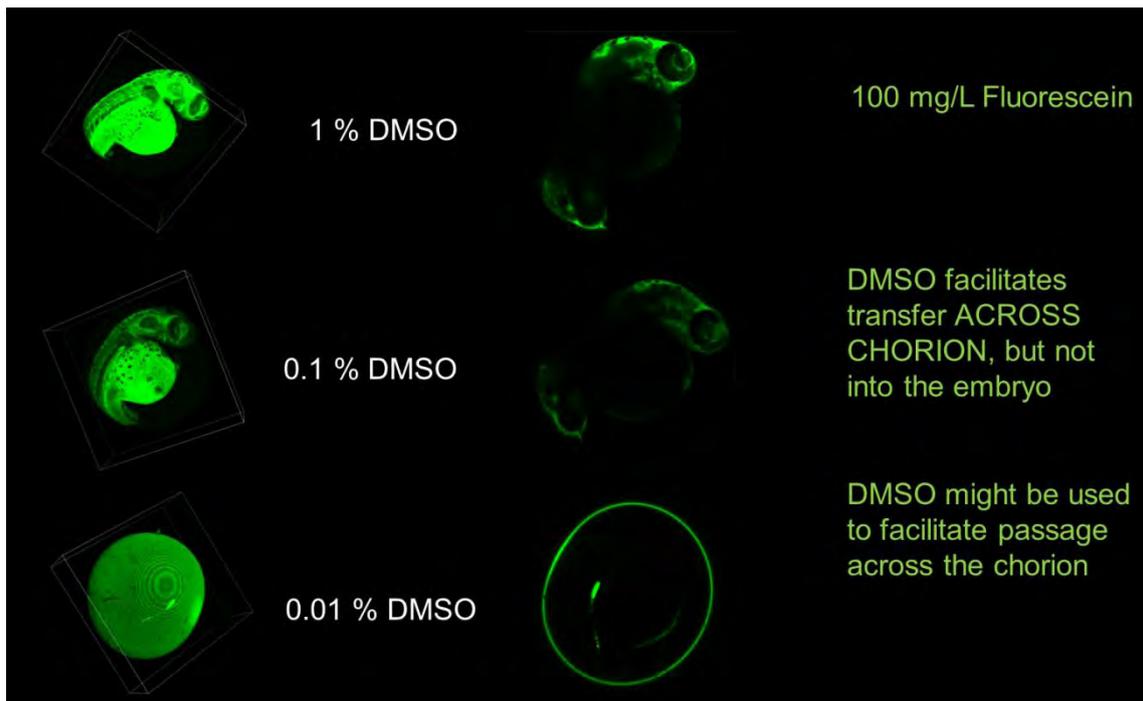


Abb. 30: Auch nach 48 h erleichtert DMSO nur den Transfer von Fluorescein über das Chorion des Zebrafährblings (*Danio rerio*), aber nicht die Aufnahme in dem Embryo selbst: Fluorescein akkumuliert auf der Oberfläcche des Embryos, dringt aber nicht vermehrt in den Embryo ein.

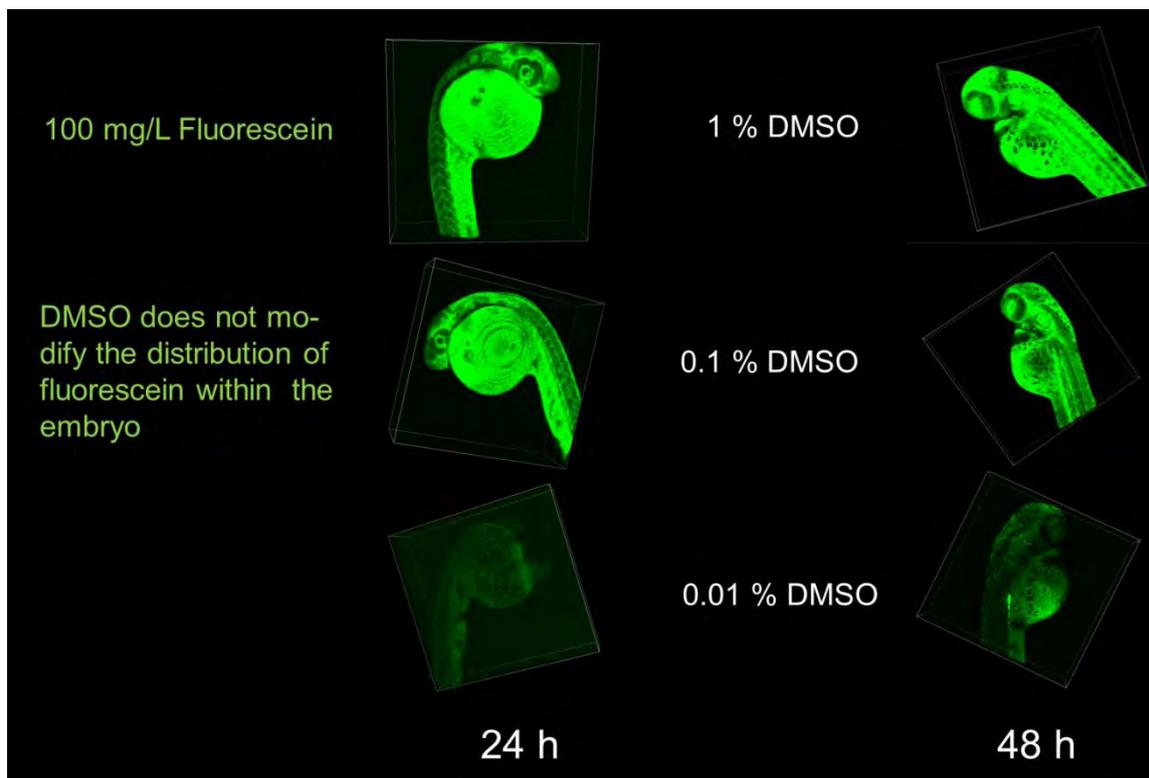


Abb. 31: Untersuchungen an dechorionierten Embryonen des Zebrafährblings (*Danio rerio*) zeigen, dass der Lösungsvermittler DMSO keinen Einfluss auf die Verteilung von Fluorescein innerhalb des Embryos nimmt: Fluorescein akkumuliert nur auf der Oberfläcche des Embryos, dringt aber nicht ein.

Die Bestimmung der Ausschlussgröße für den Transfer über das Chorion des Zebraärbhlings konnte mit weiteren Experimenten mit fluoreszenzmarkierten Dextranen (Abb. 36) und Polyethylenglykolen (Abb. 37) weiter untersucht werden.

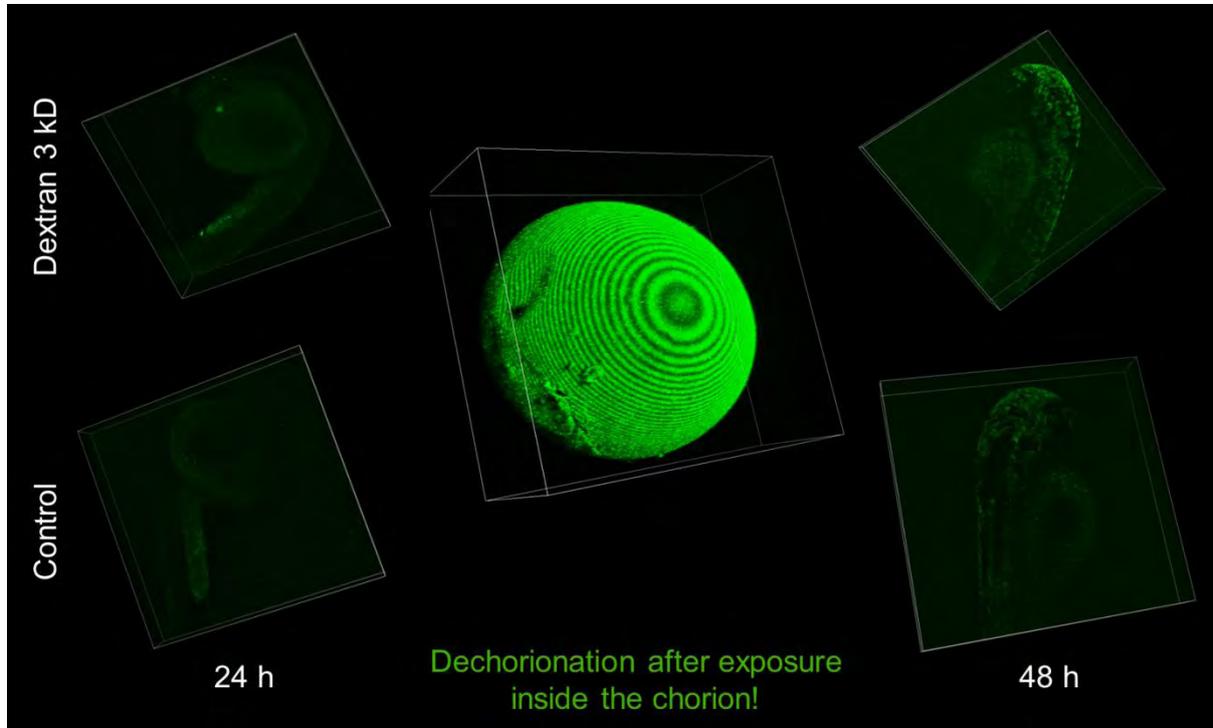


Abb. 32: Fluoreszenzmarkierte Dextrane werden ab einer Molekulargröße von 3000 Dalton nicht mehr über das Chorion des Zebraärbhlings (*Danio rerio*) hinweg transportiert: Das Fluoreszenzsignal akkumuliert ausschließlich auf der äußeren Oberfläche des Chorions, während im Embryo kein Signal zu sehen ist. Es deutet sich eine Ausschlussgrenze von ca. 3000 D ab.

Wenn an sich nicht toxische Polyethylenglykole aufgrund ihrer Molekulargröße nicht über das Chorion aufgenommen werden können, kommt es zur Ausbildung eines starken osmotischen Gradienten, der zu einem Wasseraustritt über das Chorion und schließlich zu einer Schrumpfung des gesamten Eis führt. Eine Versuchsreihe mit unterschiedlich großen Polyethylenglykolen zeigt, dass auch für die Substanzgruppe der Ausschluss für den Transfer über das Chorion des Zebraärbhlings bei knapp unter 3000 Dalton liegt, da bei 3000 Dalton nur sehr geringe Schrumpfungen des Eis eintreten (Abb. 33).

Mit Hilfe ¹⁴C-markeierter Substanzen konnte schließlich in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Preuß an der RWTH Aachen untersucht werden, ob ausgewählte organische Substanzen entsprechend ihrer Lipophilie (Abb. 34) über das Chorion aufgenommen werden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Aufnahme der ausgewählten Modellsubstanzen *nicht* in einen linearen Zusammenhang mit der Lipophilie (Kow) der Substanzen gebracht werden können – weder was die Akkumulation innerhalb des Chorions, noch was die Akkumulation innerhalb des Embryos angeht (Abb. 35). Die vielfach geäußerte Annahme, dass vor allem lipophile Substanzen *nicht* über das Chorion des Zebraärbhlings aufgenommen werden könnten, konnte damit eindeutig *widerlegt* werden.

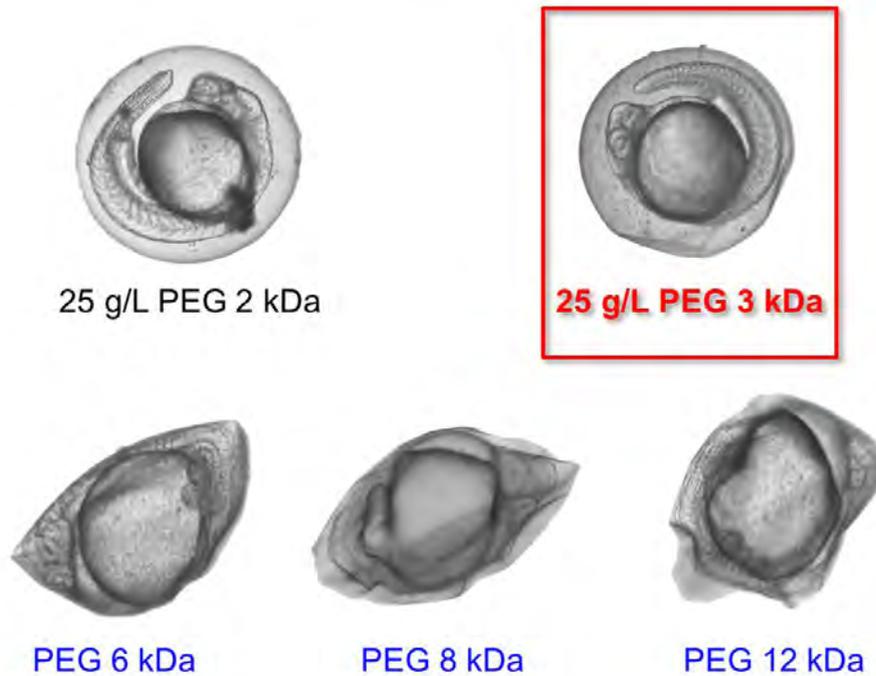


Abb. 33: Werden Polyethylenglykole, die in hohen Konzentrationen außerhalb des chorionierten Embryos angeboten werden, nicht über das Chorion transportiert, kommt es zur Ausbildung eines osmotischen Gradienten, der zum Austritt von Flüssigkeit aus dem Ei und letztlich zu einer Schrumpfung des Eis führt. Offensichtlich werden auch Polyethylenglykole bis zu einer Molekülgröße von ca. 3000 Dalton über das Chorion des Zebrafärblings transportiert.

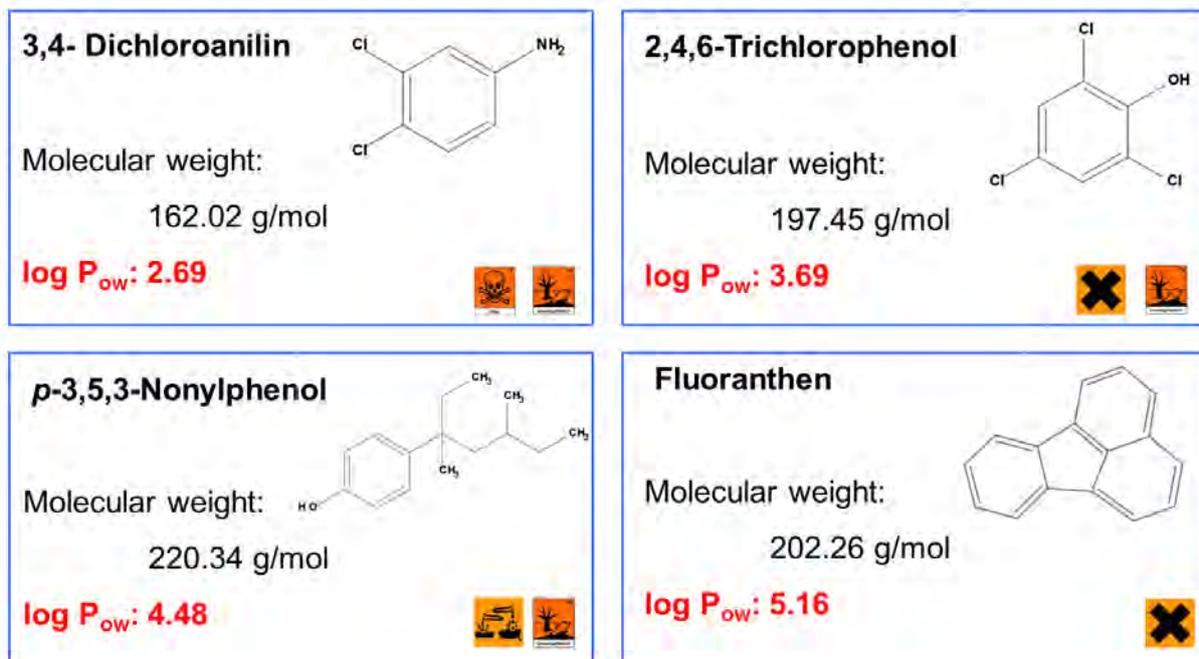


Abb. 34: Gegenüberstellung von ausgewählten organischen Modellsubstanzen nach ihrer Lipophilie, die nach radioaktiver Markierung mit ¹⁴C hinsichtlich ihrer Aufnahme über das Chorion des Zebrafärblings (*Danio rerio*) untersucht wurden.

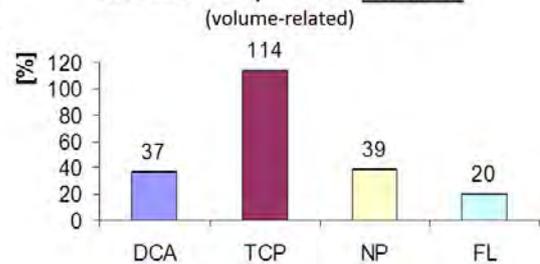


Thickness chorion: 1.5 - 2.5 μm

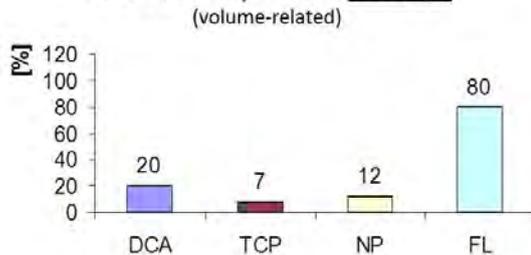
Surface area: 4.10 mm^2

Volume chorion: 0.025 mm^3

Radioactivity inside chorion



Radioactivity inside embryo



Volume _{embryo}: 0.430 mm^3

Abb. 35: Die Aufnahme von unterschiedlicher lipophiler Substanzen (vgl. Abb. 34; 3,4-Dichloranilin (DCA) log Pow 2,69; 2,4,6-Trichlorphenol (TCP) log Pow 3,69; para-3,5,3-Nonylphenol (NP) log Pow 4,48; Flouranthen (FL) log Pow 5,16) über das Chorion des Zebrafährblings (*Danio rerio*) weist keinen linearen Zusammenhang mit der Akkumulation der Substanzen innerhalb des Chorions (oben) oder innerhalb des Embryos (unten) auf.

Insgesamt können aus den bisher abgeschlossenen Untersuchungen folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- (1) Gut wasserlösliche, aber nicht dissoziierte Substanzen werden in der Regel problemlos über das Chorion des Zebrafährblings und in den Embryo aufgenommen.
- (2) Substanzen mit geladenen Seitengruppen und einem Molekulargewicht unter 3000 Dalton diffundieren erst nach Erreichen eines Alters von 48 h.
- (3) Substanzen mit einem Molekulargewicht von > 3000 Dalton passieren das Chorion des Zebrafährblings nicht.
- (4) Die Molekülkonfiguration der Substanz beeinflusst die Aufnahme der Substanz über das Chorion des Zebrafährblings.
- (5) DMSO-Konzentrationen $> 0,1$ % reduzieren die Barrierefunktion des Chorions des Zebrafährblings, sofern diese überhaupt existiert.

9. Der Fischembryotest im Durchfluss – die Lösung aller Probleme?

Um Adsorptionsphänomene an das im Fischembryotest verwendete Plastikmaterial zu minimieren, wurden 24-Well-Platten für den Durchflussbetrieb umgebaut. Es konnte jedoch nur für einen Teil der sog. „Ausreißer“ in der Korrelation zwischen Fischembryotest und konventionellen Fischttest eine Annäherung der Befunde im Fischembryotest an die Befunde im Fischttest erreicht werden. Adsorptionsphänomene sind also nur zum Teil für die Abweichungen zwischen den beiden Testsystemen verantwortlich.

*Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendler, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. In Vitro 23: 1436-1442 (Anhang 13).*

Adsorption der Testsubstanz an den Probengefäßen ist eine Problematik in jedem Testsystem, wenn lipophile Substanzen getestet werden. Im akuten Fischttest werden lipophile Substanzen im Durchfluss getestet. Somit könnten Abweichungen zwischen den Ergebnisse im Fischembryotest und im akuten Fischttest auch durch starke Adsorption der Testsubstanz am Plastikmaterial der 24-Well-Platten zustande kommen, so dass die Testsubstanzen nicht mehr biologisch verfügbar sind. Da eine Durchflussvariante für 24-Well-Platten kommerziell nicht erhältlich ist, wurden im vorliegenden Projekt 24-Well-Platten einzeln umgebaut, so dass sie im Durchfluss betrieben werden konnten (Abb. 36).

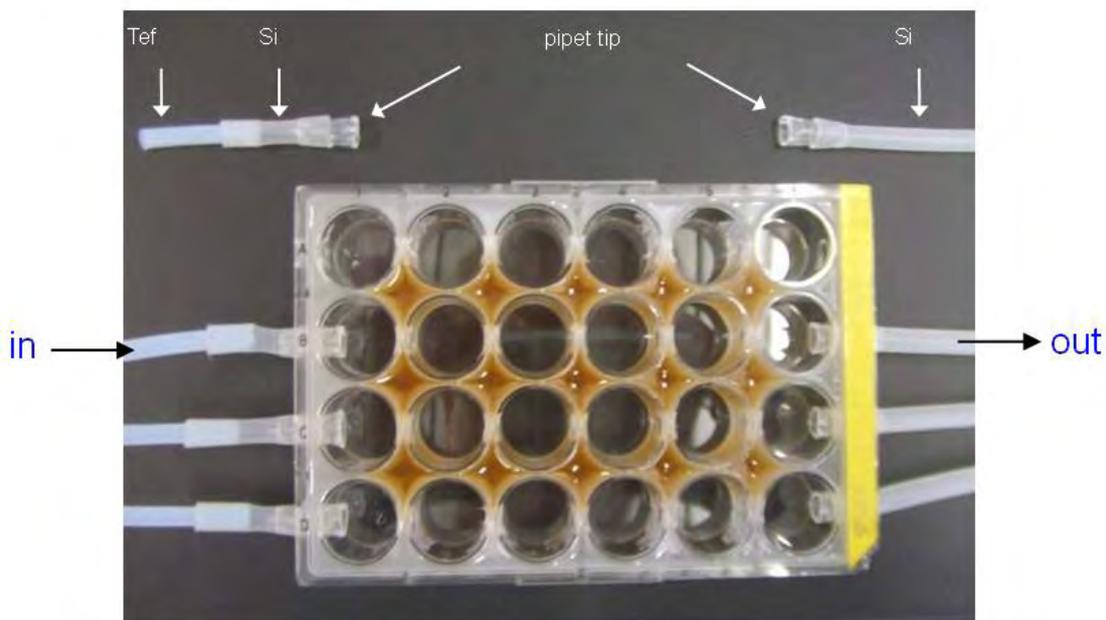


Abb. 36: Kommerziell erhältliche 24-Well-Platten wurden von ihrer Rückseite mit Polyesterharzen ausgegossen und dann mit einem langen Bohrer in Längsrichtung durchbohrt, so dass 4 Straßen à 6 Wells entstanden, die dann seriell im Durchfluss beschickt werden konnten.

Während durch den Durchfluss für eine Reihe von Substanzen, die vorher als Ausreißer galten (z.B. Endosulfan), eine deutliche Annäherung der Fischembryotestbefunde erreicht werden konnte, konnte für andere Substanzen nachgewiesen werden, dass die Abweichungen nicht auf Adsorptionsphänomene zurückzuführen sind (Bsp.: 4-Chlorphenol; Abb. 37).

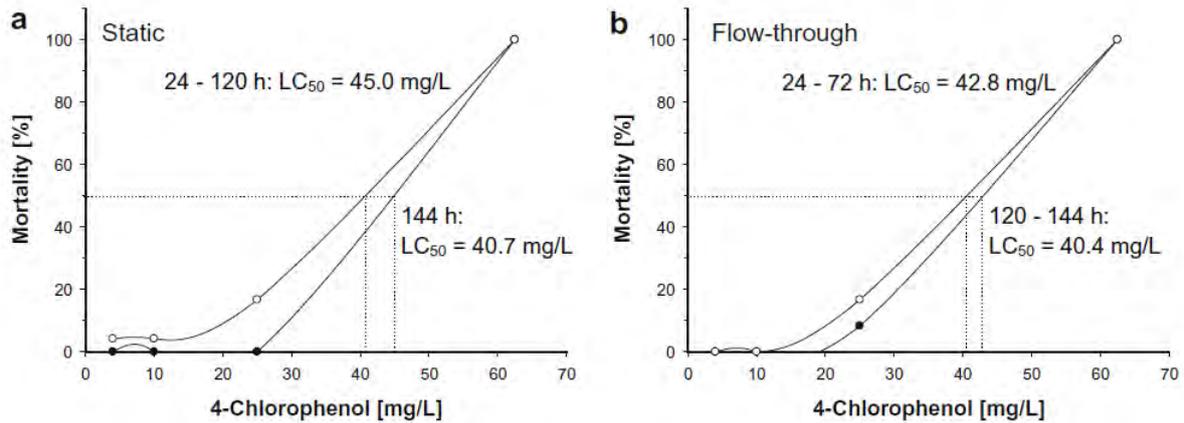


Abb. 37: Akute Toxizität (24 h) von 4-Chlorphenol bei Embryonen des Zebraäbrblings nach (a) statischer Belastung und (b) Belastung im Durchfluss.

Durch eine Exposition im Durchfluss konnte für die o.g. Substanzen gezeigt werden, dass Adsorption an den Gefäßwänden die Ursache für abweichenden Ergebnisse im Embryotest und akuten Fischtest sind. Vorteil eines Durchflusssystems sind die größeren Mengen an Testlösung, was die Analytik der realen Substanzkonzentrationen wesentlich erleichtern kann. Vor allem aber eignet sich die Durchflussvariante des Fischembryotests, wenn eine längerfristige Exposition – z.B. im Sinne einer Erweiterung auf einen Teratogenitätstest – angestrebt wird.

Da es bisher keine kommerziell erhältlichen 24-Well-Platten für den Durchflussbetrieb gibt, ist das System für den Routineinsatz nicht geeignet. Im Vorschlag für den OECD Fischembryotest, ist daher eine Sättigung der 24-Well-Platten für 24h mit der Testlösung und ein täglicher Wechsel der Testlösung vorgesehen. Darüber hinaus ist die Analytik der Testlösung festgelegt, so dass Substanzverluste nachgewiesen werden.

10. Die Korrelation zwischen dem Fischembryotest und dem akuten Fischttest

Um die Eignung des Fischembryotests auch für die Chemikalienprüfung zu prüfen, wurden die Ergebnisse aus dem Fischembryotest und dem akuten Fischttest korreliert. Insgesamt wurden Toxizitätsuntersuchungen zu 143 Substanzen erfasst und statistische Verfahren entwickelt, um sowohl die Variabilität der Daten innerhalb von Fischembryotests als auch innerhalb von Fischttests ebenso zu prüfen wie die eigentliche Korrelation zwischen dem akuten Test und dem FET. Die Ergebnisse dokumentieren eine sehr gute Korrelation zwischen Fischembryotest und akuten Fischttest. Die Variabilität von Toxizitätsdaten, die an verschiedenen Fischarten erhoben wurden, ist genauso groß wie oder größer als die Abweichungen zwischen Fisch- und Fischembryotest. Auch die Korrelation zwischen Embryonen und Eleutheroembryonen ist ausgezeichnet. Die Zahl an Ausreißern ist sehr klein, so dass das Risiko falsch positiver oder falsch negativer Befunde gering ist.

Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. 149C: 196-209 (Anhang 14).

Der akute Fischttest hat einen festen Platz in verschiedenen ökotoxikologischen Prüfschemata. Andererseits ist der akute Fischttest nicht mehr kompatibel mit den Anforderungen des Tierschutzes: Zweifellos ist ein Fischttest mit einer erheblichen Belastung im Sinne von Schmerz und Leiden für die Fische verbunden. Die neue EU-Chemikaliengesetzgebung (REACH) fordert Tierversuche durch Alternativmethoden in allen Fällen zu ersetzen, in denen dies möglich ist. Nachdem der Fischembryotest zumindest in Deutschland den Fischttest in der Abwasserprüfung routinemäßig ersetzt, ging das Umweltbundesamt einen Schritt weiter und brachte den Fischembryotest auch als Vorschlag für eine Alternativmethode im Rahmen des OECD-Testrichtlinienprogramms ein. Um die Eignung des Fischembryotests auch für die Chemikalienprüfung zu prüfen, wurde eine umfangreiche Analyse der Korrelation zwischen Ergebnisse aus dem Fischembryotest und Ergebnisse aus dem akuten Fischttest erstellt. Insgesamt wurden Toxizitätsuntersuchungen zu 143 Substanzen erfasst und statistische Verfahren entwickelt, um sowohl die Variabilität der Daten innerhalb von Fischembryotests als auch innerhalb von Fischttests ebenso zu prüfen wie die eigentliche Korrelation zwischen akutem Test und FET. Die Ergebnisse dokumentieren generell eine sehr gute Korrelation zwischen Fischembryotest und akutem Fischttest (Abb. 38).

Die Variabilität von Toxizitätsdaten, die an verschiedenen Fischarten erhoben wurden, ist genauso groß oder größer als die Abweichungen zwischen akutem Fischttest und Fischembryotest – der Fischembryo könnte wie eine weitere Fischart in die Analyse eingehen (Tab. 7).

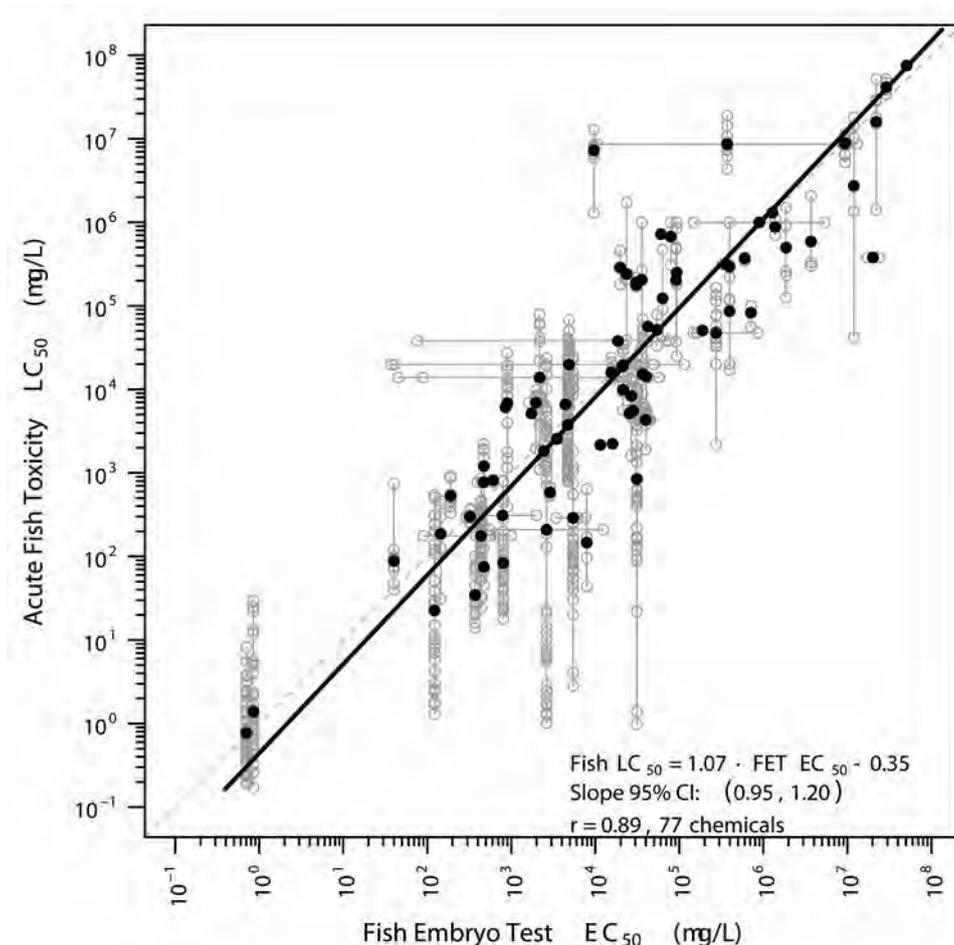


Abb. 38: Korrelation aller verfügbaren Toxizitätsdaten aus Fischembryotests und akuten Fischtests für 77 Chemikalien. Konfidenzintervalle geben die Variabilität der Fischembryodaten (horizontal) bzw. Fischdaten (vertikal) an. Die gestrichelte Linie gibt die Idealkorrelation (1:1) an. Der extrem kleine y-Achsen-Abschnitt zeigt, dass auch eine sehr geringe Toxizität vom Fischembryotest mit großer Präzision angezeigt wird.

Tab. 7: Korrelationen (R^2) von akuten Fischttestdaten für 5 OECD Fischarten, wobei alle vorhandenen Literaturdaten und Einträge in Datenbanken berücksichtigt wurden (alle Expositionsszenarien: statisch, semistatisch, Durchfluss; mit und ohne analytische Bestätigung der Prüfkonzentrationen). Alle Korrelationen sind statistisch signifikant (in Klammern: Zahl der Studien).

	<i>P. promelas</i>	<i>L. macrochirus</i>	<i>O. latipes</i>	<i>D. rerio</i>
<i>O. mykiss</i>	0.946 (32)	0.944 (26)	0.960 (27)	0.866 (18)
<i>P. promelas</i>		0.956 (31)	0.942 (28)	0.825 (18)
<i>L. macrochirus</i>			0.899 (19)	0.915 (14)
<i>O. latipes</i>				0.719 (12)

Auch die Korrelation zwischen Tests mit nicht geschlüpften Embryonen und Eleutheroembryonen ist ausgezeichnet; die Wahrscheinlichkeit, dass eine Substanz durch das Chorion zurückgehalten wird, ist also ebenfalls relativ gering (Abb. 39). Die Zahl an Ausreißern, also Substanzen, für die die Daten aus Fisch- und Fischembryotest sich stark unterscheiden, ist insgesamt sehr klein, so dass das Risiko falsch positiver oder falsch negativer Ergebnisse gering ist bzw. nicht größer als bei der Durchführung eines akuten Fischtests.

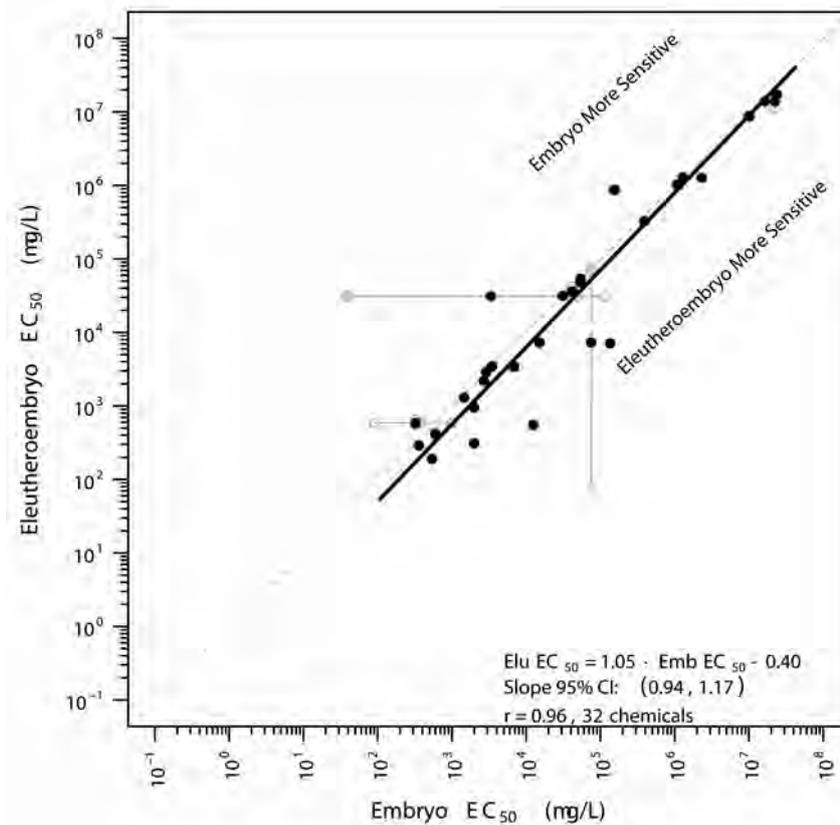


Abb. 39: Korrelation zwischen Daten aus Tests mit nicht geschlüpften Embryonen des Zebraäbblings und Eleutheroembryonen des Zebraäbblings für 32 Substanzen. Die gestrichelte Linie gibt die Idealkorrelation (1:1) an.

11. Entwicklung von Protokollen zu Fischembryotests mit Dickkopfelritze und Medaka

Bereits in früheren Projekten waren erste Protokolle für die Durchführung von Fischembryotests mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) und dem Medaka (*Oryzias latipes*) entwickelt worden. Da sich abzeichnete, dass die Akzeptanz des Fischembryotests in den USA deutlich verbessert werden kann, wenn eine zum Standardverfahren mit dem Zebrafisch analoge Verfahrensvorschrift für einen Fischembryotest mit der Dickkopfelritze vorliegt, wurde mit einer 2012 fertiggestellten Diplomarbeit die Weiterentwicklung des 2005 entwickelten Protokolls in Angriff genommen.

Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E. Leist, E., Rudolf, R., Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species B an update. ALTEX 22: 87-102 (Anhang 15).

Böhler, S. (2012) The fathead minnow embryo as a model for the development of alternative testing methods in ecotoxicology. Diplomarbeit, Universität Heidelberg (Anhang 16).

Obwohl ursprünglich im Antrag zu diesem Gesamtprojekt vorgesehen, wurde zunächst keine weitere Optimierung der Protokolle für Fischembryotests mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) und dem Medaka (*Oryzias latipes*) vorgenommen, da die OECD *Ad hoc*-Expertengruppe beschlossen hatte, den Fischembryotest zunächst nur mit dem Zebrafisch weiterzuverfolgen. Es lag jedoch aus früheren Arbeiten der Heidelberger Arbeitsgruppe ein Vorschlag für die Adaption der Verfahrensweise mit dem Zebrafisch an die beiden anderen OECD-Fischarten vor (Tab. 8). Nach vorläufigen Daten ergeben diese Anpassungen eine gute Korrelation der Ergebnisse aus Fischembryotests mit der Dickkopfelritze und dem Medaka mit Toxizitätsdaten aus Fischembryotests mit dem Zebrafisch (Tab. 9). Da sich jedoch seit 2010 abzeichnete, dass die Akzeptanz des Fischembryotests in den USA deutlich verbessert werden kann, wenn eine zum Standardverfahren mit dem Zebrafisch analoge Verfahrensvorschrift für einen Fischembryotest mit der Dickkopfelritze vorliegt, wurde mit einer 2012 fertiggestellten Diplomarbeit die Weiterentwicklung des 2005 entwickelten Protokolls in Angriff genommen.

Tab. 8: Daten zur Hälterung und Zucht von Zebrabärbling, Dickkopfelritze und Medaka sowie zur spezifischen Durchführung von Fischembryotests mit diesen Fischarten

	Zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	Fathead min-now (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)
Origin of species	India, Burma, Malakka, Sumatra	Temperate zones of central North America	Japan, China, South Korea
Sexual dimorphism	Females: protruding belly when carrying eggs Males: more slender, orange tint between blue longitudinal stripes (particularly evident at the anal fin)	Females: more plump when carrying eggs, ovipositor Non-spawning males: black spot on dorsal fin Spawning males: black coloration of head, dorsal nuptial pad and nuptial tubercles in spawning season, black bands along body sides	Females: generally more plump, carrying sticky eggs at anal fin Males: anal fin larger, papillary processes on posterior dorsal fin rays
Feeding regime	Dry food (TetraMin; Tetra, Melle, FRG) once daily; from three days before spawning, plus frozen adult brine shrimp (<i>Artemia spec.</i>) twice daily (<i>ad libitum</i>). To guarantee for optimal water quality, excess faeces was removed approx. one hour after feeding.		
Wet weight of adult fish	Females: 0.65 ± 0.13 g Males: 0.5 ± 0.1 g	Females: 1.5 ± 0.3 g Males: 2.5 ± 0.5 g	Females: 0.35 ± 0.07 g Males: 0.35 ± 0.07 g
Illumination	Fluorescent bulbs (wide spectrum); 10-20 µE/M ² /s, 540-1080 lux, or 50-100 ft-c (ambient laboratory levels); 14 h light, 10 h dark		
Water quality	26.0 ± 0.5 °C, O ₂ ≥ 8.5 mg/l, hardness: 20°dH (~ 213 mg/l CaCO ₃), NO ₃ ⁻ : ≤ 48mg/l, NH ₃ and NO ₂ ⁻ : < 0.01mg/l, pH = 7.8 ± 0.2	16.5 ± 1.5 °C, O ₂ ≥ 8.5mg/l, hardness: 20°dH (~ 213 mg/l CaCO ₃), NO ₃ ⁻ : ≤ 48mg/l, NH ₃ and NO ₂ ⁻ : < 0.01mg/l, pH = 7.8 ± 0.2	24.0 ± 0.5 °C, O ₂ ≥ 8.5mg/l, hardness: 20°dH (~ 213 mg/l CaCO ₃), NO ₃ ⁻ : ≤ 48mg/l, NH ₃ and NO ₂ ⁻ : < 0.01mg/l, pH = 7.8 ± 0.2
Further water quality criteria	Particulate matter < 20 mg/l, total organic carbon < 2 mg/l, unionized ammonia < 1 µg/l, residual chlorine < 10 µg/l, total organophosphorus pesticides < 50 ng/l, total organochlorine pesticides plus polychlorinated biphenyls < 50 ng/l, total organic chlorine < 25 ng/l		
Tank size for maintenance	180 l (max. 200 individuals)	180 l (max. 80 individuals)	50 l (max. 60 individuals)
Water purification	Permanent (internal filter)	Permanent (internal filter)	External (air-driven)
Male to female ratio for breeding	4:2	2:4	15:15
Breeding tanks	4 l tanks equipped with steel grid bottom and plant dummy as spawning stimulant; external heating mats (cf. Fig. 3)	30 l tanks with black glass walls maintained at 24°C and equipped with 2 clay tiles divided into two halves as spawning substrate	30 l tanks with black glass walls equipped with several plant dummies or <i>Ceratophyllum spec.</i> as substrate for spawning
Egg structure and appearance	Stable chorion, highly transparent, non-sticky, diameter: ~0.8 mm	Chorion only hardens in multicellular stage, transparent, sticks to surfaces, diameter < 1 mm	Stable chorion with spiny hooks (adheres to anal fin of female), moderately transparent, diameter < 1 mm
Embryo development at 25°C	18 h: Development of somites 21 h: Tail detachment 26 h: Heart-beat visible 28 h: Blood circulation 72 h: Hatching	22 h: Development of somites 25 h: Tail detachment 27 h: Heart-beat visible 30 h: Blood circulation 160 h: Hatching	28 h: Development of somites 28 h: Tail detachment 30 h: Heart-beat visible 32 h: Blood circulation 120 h: Hatching
Test type	Flow-through, 26°C, 24-well plates (2 ml per cavity)	Flow-through, 25°C, 24-well plates (2 ml per cavity)	Flow-through, 26°C, 24-well plates (2 ml per cavity)
Major toxicological endpoints at 25°C	24 h: Tail development, somite development 48 h: Heart-beat visible	28 h: Tail development, somite development 3 d: Blood circulation 3 d: Blood circulation 4 d: Blood circulation	30 h: Somite development 78 h: Blood circulation 7 d: Blood circulation 10 d: Blood circulation 14 d: Blood circulation

Tab. 9: Akute Toxizität ausgewählter Modellsubstanzen in Fischembryotests mit Zebra­bärbling, Dickkopfelritze und Medaka

	Sodium dodecyl- sulfate (mg/l)	n	Copper- sulfate (mg/l)	n	3,4-Dichloro- aniline (mg/l)	n	2,4-Dinitro- phenol (mg/l)	n
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)								
24 h	3,96 ± 0,33	3	0,25 ± 0,08	4	3,28 ± 0,32	5	1,91 ± 0,33	4
48 h	4,68 ± 0,76	6	0,26 ± 0,07	6	3,44 ± 0,32	5	1,48 ± 0,19	4
Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>)								
30 h	33,08 ± 3,54	7	2,95 ± 0,41	7	24,10 ± 11,88	6	6,42 ± 1,44	5
78 h	32,92 ± 2,79	7	2,22 ± 0,25	7	21,8 ± 2,97	7	5,24 ± 0,71	5
7 days	32,1 ± 3,08	7	1,60 ± 0,30	6	15,63 ± 1,07	7	5,42 ± 0,88	5
10 days	33,1 ± 1,41	3	1,13 ± 0,38	3	12,40 ± 3,25	3	4,53 ± 0,23	3
14 days	31,08 ± 2,97	4	0,68 ± 0,04	5	4,55 ± 1,01	5	3,88 ± 0,69	3
Fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>)								
28 h	22,68 ± 4,13	6	1,83 ± 0,29	5	17,1 ± 0,62	4	0,82 ± 0,35	6
56 h	18,82 ± 1,99	6	1,46 ± 0,48	5	8,08 ± 2,57	5	0,41 ± 0,10	4
3 days	15,37 ± 5,39	6	0,90 ± 0,01	5	5,93 ± 4,13	4	0,40 ± 0,15	4
4 days	13,83 ± 4,79	6	0,82 ± 0,08	5	4,35 ± 2,10	4	0,31 ± 0,09	4

12. Untersuchungen zur Biotransformationskapazität in Embryonen des Zebraärblings (*Danio rerio*)

Eine essentielle Frage in der Diskussion zum FET ist die Biotransformationskapazität im Fischembryo. Die Vermutung ist eine geringe Metabolisierungskapazität im Vergleich zum juvenilen / adulten Fisch, so dass dies ein kritischer Aspekt für die Verabschiedung einer OECD Test Guideline durch die nationalen KoordinatorInnen für das OECD Prüfrichtlinienprogramm ist, die beantwortet werden sollte. Im November 2011 konnten aufgrund einer Aufstockung der Mittel im Rahmen des hier beschriebenen UBA-Projekts mit Hilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie („*In vivo*-EROD-Assay“) Untersuchungen zur Biotransformationskapazität in Embryonen des Zebraärblings begonnen werden, die unmittelbar an ein Kooperationsprojekt mit der Firma Merck (Darmstadt) anschließen und in einem vom BMBF finanzierten Folgeprojekt fortgeführt werden. Die wichtigsten Befunde können wie folgt zusammengefasst werden:

- (1) Cytochrom P450 kann bereits in 8 h alten Embryonen des Zebraärblings nachgewiesen werden – und dies nicht nur als mRNA, sondern als enzymatisch aktives Protein.
- (2) Die Trennung von konstitutiv deprimiertem Cytochrom P450 1B1 von induzierbarem Cytochrom P450 1A ist in sehr frühen Stadien des Zebraärblingsembryos schwierig.
- (3) Ein erstes Maximum der Induzierbarkeit von Cytochrom P450 wird im Embryo des Zebraärblings in einem Alter von 72 h erreicht, wenn die Leber ihre volle Funktionsfähigkeit erreicht hat.
- (4) Der *In vivo*-EROD-Assay ist so empfindlich, dass auch eine konzentrations- und dauerabhängige Überstimulation des Cytochrom P450-Systems gezeigt werden kann.
- (5) Trotzdem kann die Effektivität der Bioaktivierung durch Zugabe externer Metabolisierungssysteme (S9-Mix) gesteigert werden.
- (6) An ausgesuchten Beispielen kann gezeigt werden, dass Embryonen des Zebraärblings über ein breites Spektrum von Bioaktivierungsenzymen im Bereich des Cytochrom P450-Systems verfügt, so dass eine Vielzahl unterschiedlicher Proteratogene zu den aktiven (teratogenen) Metaboliten umgesetzt werden können.

Otte, J., Schmidt, A., Hollert, H., Braunbeck, T. (2010) Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 100: 38-50 (Anhang 17).

Weigt, S., Huebler, N., Braunbeck, T., von Landenberg, F., Broschard, T.H. (2010) Zebrafish teratogenicity test with metabolic activation (mDarT): Effects of phase I activation of acetaminophen on zebrafish *Danio rerio* embryos. *Toxicology* 275: 36-49 (Anhang 18).

Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25-36 (Anhang 19).

Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141 (Anhang 20).

Fische sind wie alle Organismen prinzipiell in der Lage, die meisten Fremdstoffe, die in sie eindringen, zu verstoffwechseln (Biotransformation), wobei es in der Regel zu einer Entgiftung kommt. Da die meisten Biotransformationsreaktionen jedoch auf Reaktionsmechanismen zurückgreifen, die in der Evolution zunächst für physiologische Substrate im normalen Stoffwechsel optimiert worden waren (also die Fremdstoffe sozusagen „zufällig“ passen), ist nicht garantiert, dass die Metaboliten, die aus den Biotransformationsreaktionen hervorgehen, weniger toxisch sind; vielmehr kann es auch zu einer „Giftung“ (Bioaktivierung) kommen. Alternativen zum aktiven Fischtest wie der Fischembryotest sollten daher idealerweise ebenfalls über solche Bioaktivierungskapazitäten verfügen, da sie sonst nicht in der Lage wären, solche Fremdstoffe in ihrer Wirkung anzuzeigen, die einer Aktivierung durch endogene Biotransformationssysteme bedürfen.

Ein häufiger Einwand gegen den Einsatz des Fischembryotests als Alternative zum klassischen Fischtest bestand nun darin, dass Embryonen des Zebraärbblings über keine oder nur sehr geringe Biotransformationskapazitäten verfügen. Unterstützt wurden diese Einwände unter anderem in einer Arbeit von Mattingly und Toscano (2001)¹, die zwar die Existenz der mRNA der wohl wichtigsten Isoform des zentralen Biotransformationsenzym Cytochrom P450, aber keine enzymatische Aktivität nachweisen konnten und daher zu dem Schluss kamen, Cytochrom P450 würde im Embryo des Zebraärbblings ausgeschaltet? („silenced“).

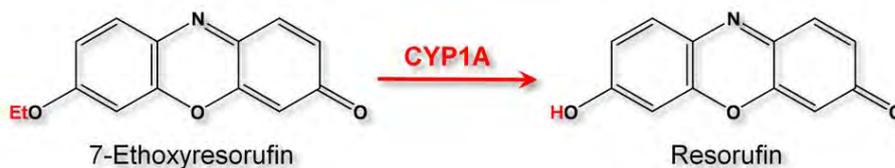
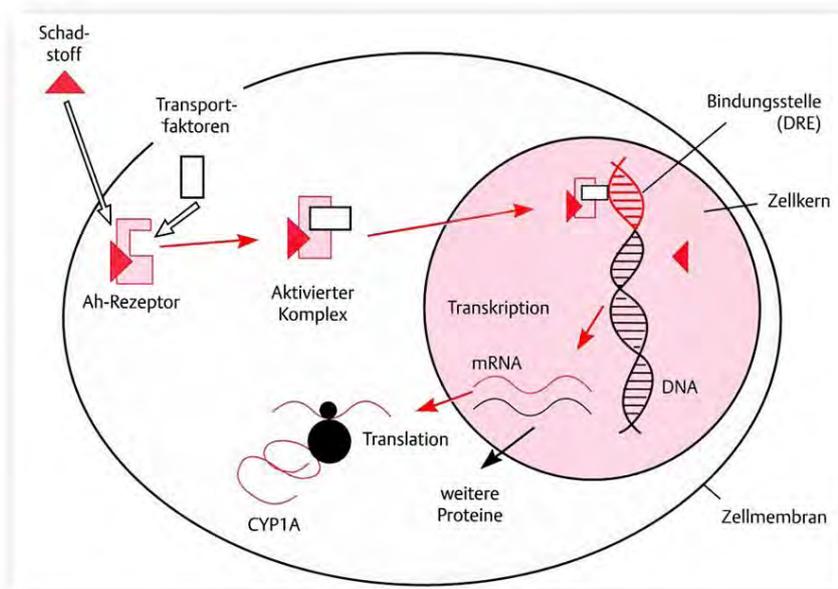


Abb. 40: Induktion von Cytochrom P450 durch das synthetische (nicht fluoreszierende) Substrat Ethoxyresorufin, das dann durch Cytochrom P450 in das fluoreszierende Resorufin umgewandelt wird.

¹ Mattingly, C.J. and Toscano, W.A. (2001) Posttranscriptional silencing of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Dev. Dyn.* 222: 645-654.

Im Zuge der Entwicklung neuer analytischer Techniken ergaben sich seitdem jedoch Möglichkeiten, auch die Aktivität von Biotransformationsenzymen sehr viel spezifischer und vor allem empfindlicher nachzuweisen. So erlaubt vor allem die konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM) inzwischen, lebende Embryonen des Zebraärbhlings fast vollständig zu durchdringen und mit geeigneten fluoreszenztechnischen Markierungen Enzyme und Stoffwechselprodukte mit enormer Empfindlichkeit, Präzision und Auflösung nachzuweisen.

Die Diplomarbeit von Jens Otte beruhte auf der Idee, dass Resorufin, der als Hauptmetabolit aus der Umwandlung von Ethoxyresorufin, einem Modells substrat von Cytochrom P450, hervorgeht, eine Eigenfluoreszenz besitzt, die im CLSM sichtbar gemacht werden kann – und zwar an genau der Stelle, an der der Metabolit entsteht. Daher wird das Signal nicht wie in einer konventionellen biochemischen Reaktion z.B. durch andere Proteine (z.B. die in riesiger Menge vorhandenen Dotterproteine) „verdünnt“, und dadurch die Nachweisschwelle herabgesetzt (Abb. 40).

So konnten Otte et al. (2010; vgl. Anhang 17) zeigen, dass Cytochrom P450 nicht nur in 32 h alten Embryonen des Zebraärbhlings (Abb. 41), sondern bereits in 8 h alten Embryonen nicht nur exprimiert wird, sondern auch aktiv ist (Abb. 42). Der Versuchsablauf zum Nachweis der Induktion von Cytochrom P450 ist schematisch in Abb. 43 dargestellt.

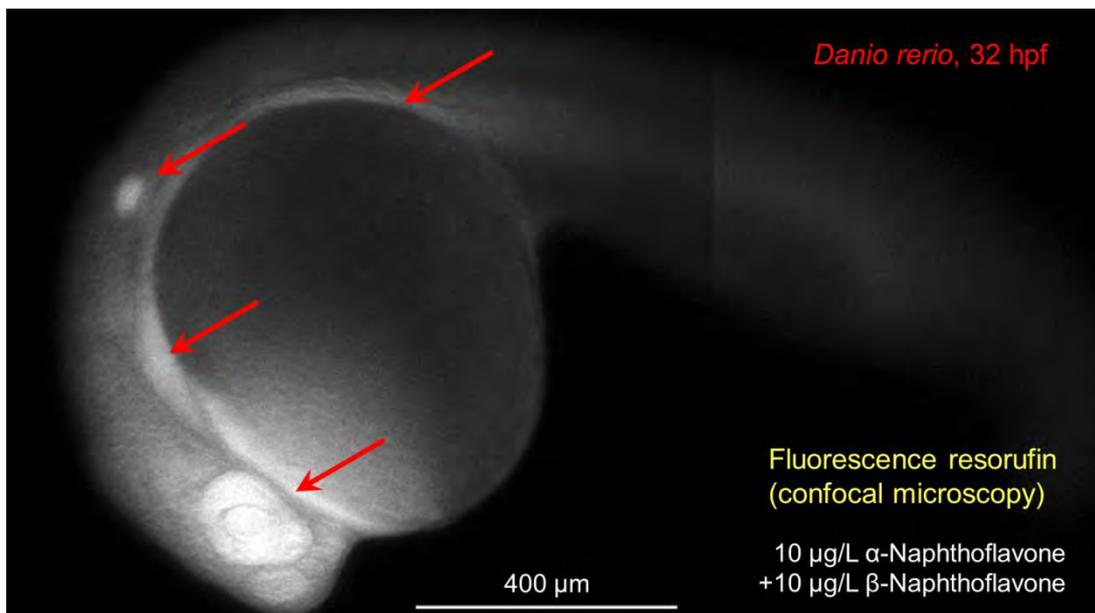


Abb. 41: Lokalisierung von Resorufin (und damit Cytochrom P450) in mit 10 µg/L β-Naphthoflavon induzierten 32 h alten Embryonen des Zebraärbhlings (*Danio rerio*). Das Signal findet sich vor allem im Gehirn, im Bereich des Herzens und der dorsalen Aorten sowie in der Ohranlage (rote Pfeile).

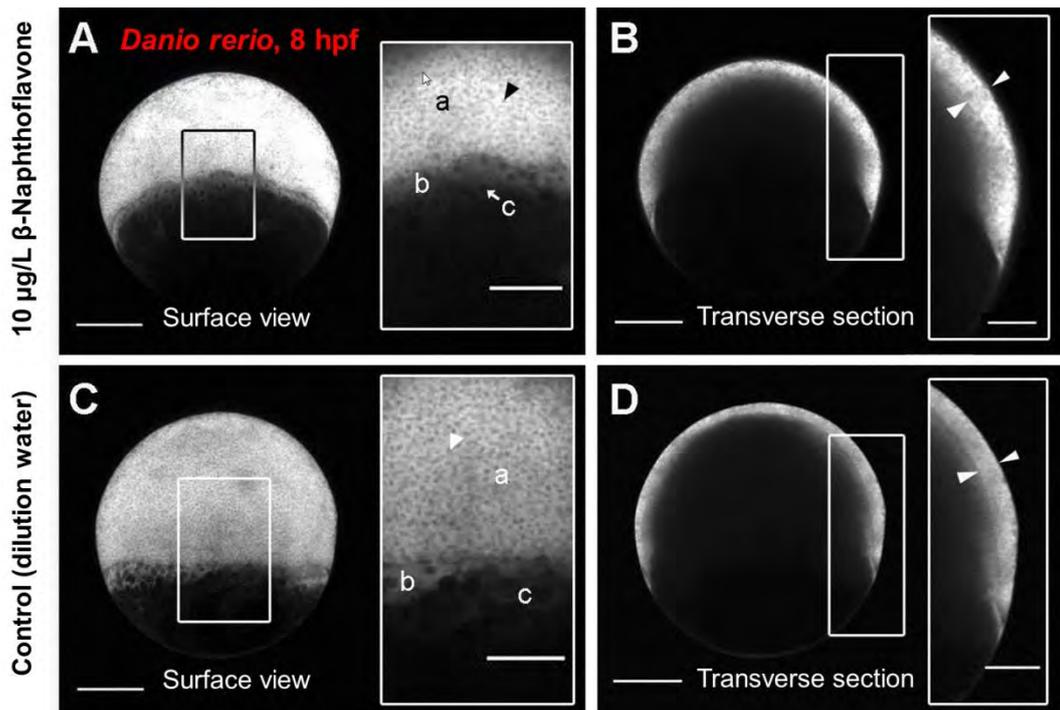


Abb. 42: Lokalisierung von Resorufin (und damit Cytochrom P450) in mit 10 µg/L β-Naphthoflavon induzierten (obere Reihe) und nicht induzierten 8 h alten Embryonen des Zebraäbrblings (*Danio rerio*; Kontrollen; untere Reihe). Das Signal zeigt deutlich die Gegenwart sogar konstitutiver Aktivität in 8 h alten Embryonen; vermutlich überdecken sich allerdings Signale von Cytochrom P450 1A (induzierbar: v.a. Leber, Galleblase und Darm) und Cytochrom 1B1 (konstitutiv; v.a. Gehirn und Auge).

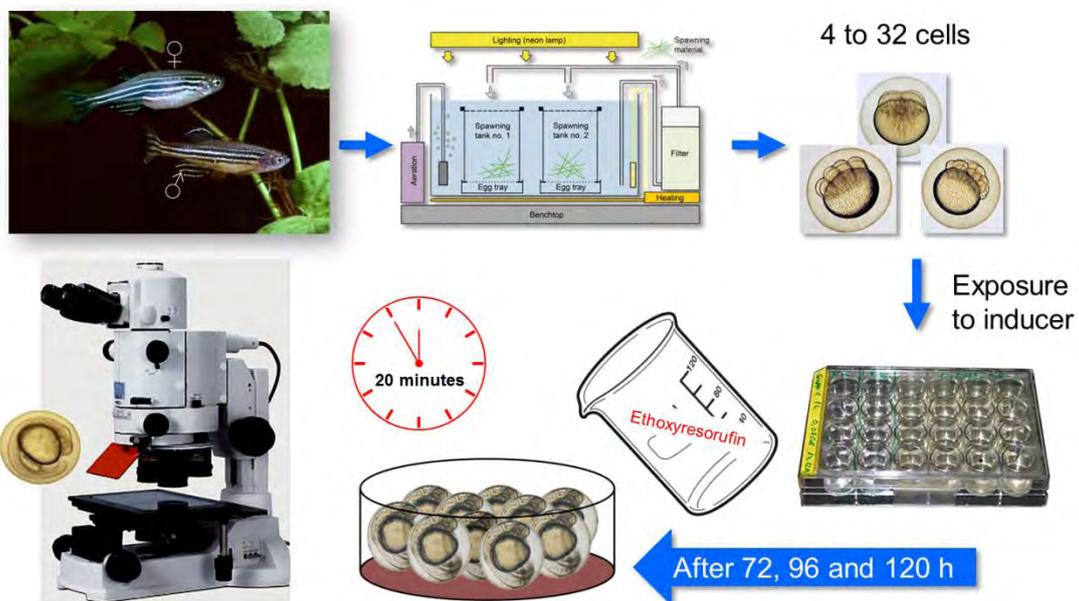


Abb. 43: Versuchsschema zum Nachweis der Aktivität von Cytochrom P450 in Embryonen des Zebraäbrblings (*Danio rerio*): Die Embryonen werden den potentiellen Induktoren exponiert und nach unterschiedlicher Expositionsdauer unter dem konfokalen Laserscanningmikroskop untersucht, wobei die Menge des induzierten Cytochrom P450 über die Umwandlung von Ethoxyresorufin in Resorufin sichtbar gemacht (und eingeschränkt auch quantifiziert) wird.

Die Stärke des durch Cytochrom P450 ausgelösten Signals in diesem sogenannten „*In vivo*-EROD-Assay“ ist aber stark vom Entwicklungsstadium der Embryonen abhängig: Während durch β -Naphthoflavon in 24 und 48 h alten Embryonen vor allem konstitutive Signale von Cytochrom P450 1B1 ausgelöst werden (Abb. 44: obere Reihe), dominiert ab einem Embryonalalter von 72 h (Abschluss der Differenzierung der Leber, dem Hauptsyntheseort für Cytochrom P450 1A), das induzierbare Signal von Cytochrom P450 1A in Leber, Gallenblase und Darmtrakt der Embryonen (Abb. 44: mittlere und untere Reihe).

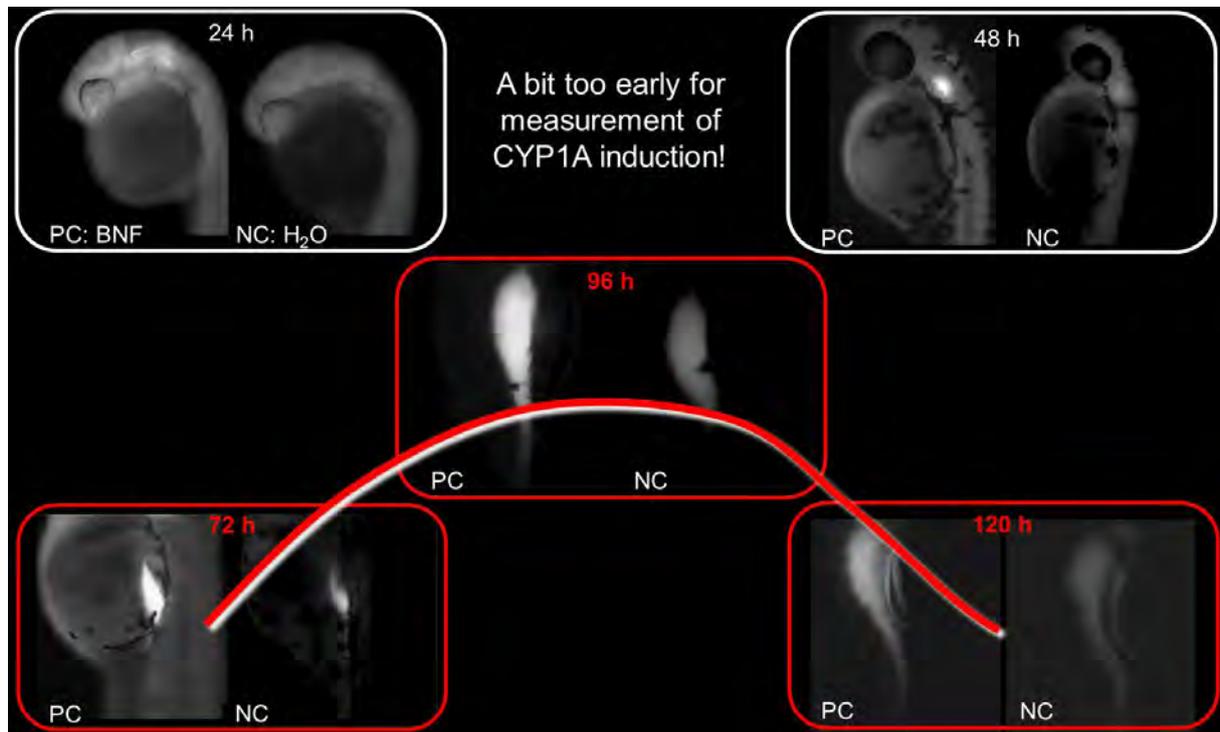


Abb. 44: Induktion der Aktivität von Cytochrom P450 1B1 in 24 und 48 h alten Embryonen des Zebrafischarbings (*Danio rerio*; oben rechts und links) sowie der Aktivität von Cytochrom P450 1A in Leber, Gallenblase und v.a. Darmtrakt von 72, 96 und 120 h alten Embryonen des Zebrafischarbings, wobei nach ca. 96 h das stärkste Signal abzubilden ist (was vermutlich zur Schlussfolgerung von Mattingly und Toscano (2001) geführt hat). PC – Positivkontrolle (β -Naphthoflavon); NC – Negativkontrolle (Medium).

In einem neuen, vom BMBF geförderten Projekt („ToxBox“) wird zurzeit die Wirkung neurotoxischer Fremdstoffe in Embryonen des Zebrafischarbings untersucht. Um die toxikologischen Effekte einer Aktivierung von Fremdstoffen zu illustrieren, soll an dieser Stelle die durch die Aktivierung von Chlorpyrifos zu Chlorpyrifos-oxon gezeigt werden: Während die Ausgangssubstanz Chlorpyrifos kaum zu toxischen und teratogenen Effekten führt, löst der über Cytochrom P450 1A gebildete Metabolit Chlorpyrifos-oxon massive teratogene Effekte aus (Abb. 45).

Die extreme Empfindlichkeit des Nachweises der Aktivität von Cytochrom P450 in den lebenden Embryonen des Zebrafischarbings führt dazu, dass klassische Induktoren wie Aroclor 1254 oder PCB 126 schnell zu einer Sättigung des Systems und einer anschließenden Hemmung bei höheren Konzentrationen der Induktoren führen (Abb. 46).

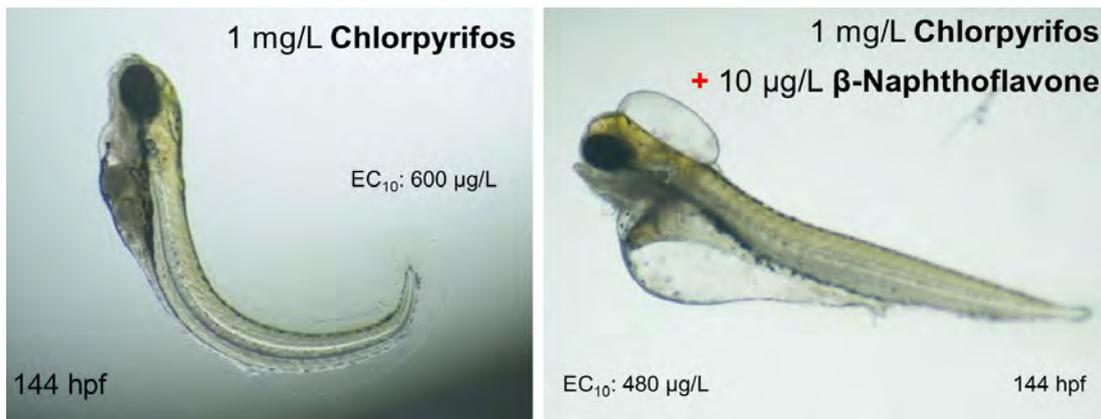


Abb. 45: Während Chlorpyrifos alleine nur in sehr hohen Konzentrationen zu teratogenen Effekten in 144 h alten Embryonen des Zebraäbrblings (*Danio rerio*; Wirbelsäulenverkrümmung, links) führt, wird durch Zugabe von β -Naphthoflavon Cytochrom P450 1A induziert, das Chlorpyrifos zu dem wesentlich toxischeren Chlorpyrifos-oxon aktiviert (extreme Ödeme im Bereich des Kopfes und des Dotters bzw. des Rumpfes, links).

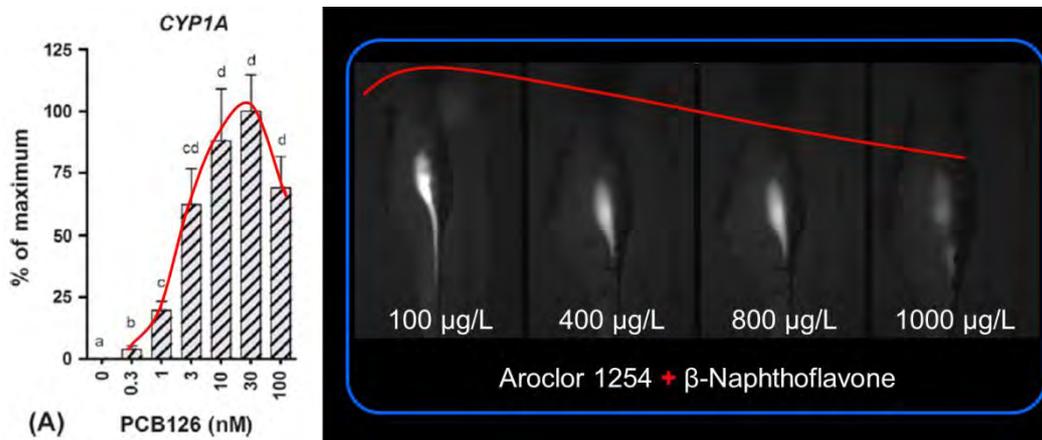


Abb. 46: Induktion von Cytochrom P450 1A in Embryonen des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) durch die klassischen Induktoren PCB 126 (Jönsson et al. (2007)²) und Aroclor 1254 (eigene Daten): Bei Überschreitung einer maximalinduzierenden Konzentration von 30 nM PCB 126 bzw. 100 $\mu\text{g/L}$ Aroclor wird das Cytochrom P450 1A-System im Sinne einer negativen Rückkopplung wieder heruntergeregelt.

Aus den Ergebnisse aus mehreren Experimenten zeichnet sich ab, dass bereits eine dreistündige Belastung der Embryonen des Zebraäbrblings zu einer optimalen Induktion des Cytochrom P450-Systems führt, während eine längere Belastung schon wieder zu einer Abschwächung des Signals im *In vivo*-EROD-Assay führt. Das bedeutet, dass für den Nachweis der Induktion von Cytochrom P450 in lebenden Embryonen des Zebraäbrblings immer eine vollständige Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt werden muss, weil es durch die Exposition gegenüber „klassischen“ Induktorkonzentrationen schnell zu einer Übersättigung des Systems kommen kann, aus der ein Mangel an Induzierbarkeit des

² Jönsson, M.E., Jenny, M.J., Woodin, B.R., Hahn, M.E., Stegeman, J.J., 2007a. Role of AHR2 in the expression of novel cytochrome P450 1 family genes, cell cycle genes, and morphological defects in developing zebrafish exposed to 3,3,4,4,5-pentachlorobiphenyl or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol. Sci.* 100, 180–193.

Cytochrom P450-Systems geschlossen werden kann. Diese Überlastung des Cytochrom P450-Systems konnte im Anschluss auch eindrucksvoll für die Extrakte ausgewählter Sedimentextrakte als Beispiele für reale Umweltproben dokumentiert werden (Abb. 47).

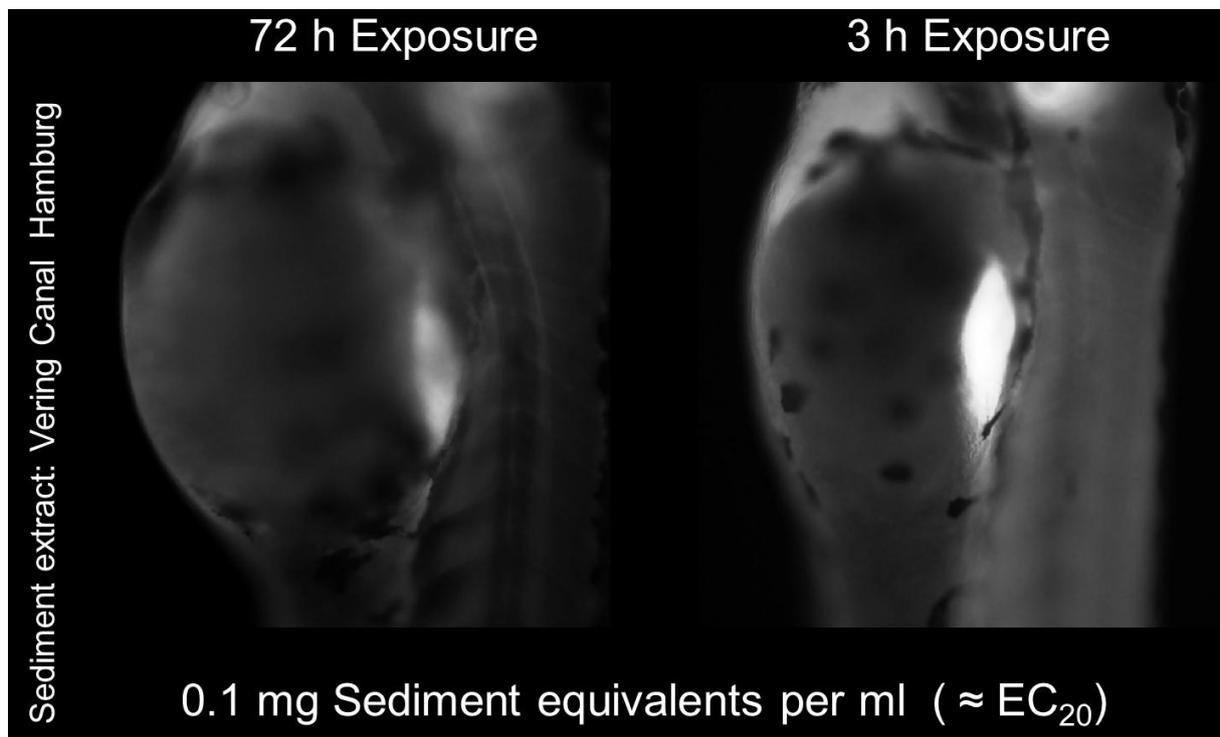
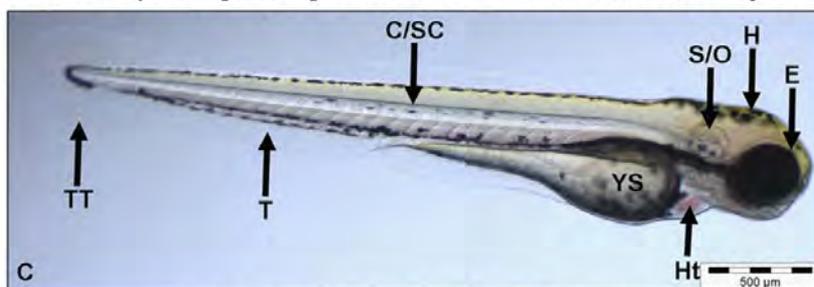


Abb. 47: Die Induktion des Cytochrom P450-Systems in Embryonen des Zebraärlings (*Danio rerio*) durch Belastung mit Extrakten aus Sedimenten ist nach einer dreistündigen Exposition stärker als nach 72stündigen Belastung (Ergebnisse aus BMBF-Projekt „ToxBox“).

In einem Kooperationsprojekt mit der Firma Merck (Darmstadt) konnte im Rahmen der Dissertation von Dr. Stefan Weigt gezeigt werden, dass die Biotransformationskapazität von Embryonen des Zebraärlings durch Zugabe exogener metabolischer Aktivierungssysteme (z.B. in Form von S9-Überständen aus den Leberhomogenaten von Ratten, die diversen Induktoren des Cytochrom P450-Systems ausgesetzt worden waren) gesteigert werden kann. So konnte für das Proteratogen Acetaminophen gezeigt werden, dass durch die Zugabe von aktivierendem S9-Mix sehr viel stärkere teratogene Effekte ausgelöst werden als ohne S9-Zugabe (Abb. 48; Weigt et al. 2010; Anhang 18).

In weiteren Teratogenitätsexperimenten mit den Proteratogenen 2-Acetylaminofluoren, Benzo[a]pyren, Aflatoxin B1, Carbamazepin, Phenytoin, Trimethadion, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Tegafur und Thio-TEPA konnte eindrucksvoll belegt werden, dass Embryonen des Zebraärlings sehr wohl über ein breites Spektrum von Biotransformationsenzymen verfügen (Tab. 10; Weigt et al. 2011; Anhang 19). In einem Experiment zur Wirkung des Cumarinderivates Warfarin konnte sogar gezeigt werden, dass die Embryonen des Zebraärlings in der Metabolisierung (Aktivierung) dieses Proteratogens bemerkenswerte Ähnlichkeit mit dem Mensch aufweisen, die sogar größer ist als jene in etablierten Säuger-(Nager-)Modellen (Abb. 49; Weigt et al. 2012; Anhang 20).

Control zebrafish embryo (72 hpf):
Acetaminophen [6 mM] without metabolic activation system



Zebrafish embryos (72 hpf) exposed to
acetaminophen (APAP) [6 mM] and metabolic activation system (rat microsomes)



Abb. 48: Während Kontrollembryonen des Zebraärlings (*Danio rerio*), die über einen Zeitraum von 72 h dem Proteratogen Acetaminophen ausgesetzt waren, kaum teratogene Effekte zeigen, weisen Embryonen, deren Bioaktivierungssystem durch exogene Zugabe von S9-Mix („metabolisches Aktivierungssystem“) massive Fehlbildungen auf, die nur durch Aktivierung von Acetaminophen zu reaktiven Metaboliten erklärt werden können (Weigt et al. (2010); vgl. Anhang 18).

Tab. 10: Letale und teratogene Effekte in Embryonen des Zebraärlings (*Danio rerio*) nach Belastung mit diversen Proteratogenen OHNE exogene Bioaktivierung.

Category	Physiological/dysmorphogenic effect	8 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf
Lethal effect	Coagulated egg ^a	+	+	+	+
	No heart beat				+
Teratogenic effects	Malformation of head		+	+	+
	Malformation of eyes		+	+	+
	Modification of the spinal chord		+	+	+
	Modification of the chorda		+	+	+
	Malformation of tail ^b		+	+	+
	Malformation of tail tip ^c		+	+	+
	Scoliosis		+	+	+
	Malformation of sacculi/otoliths ^d		+	+	+
	Malformation of heart ^e		+	+	+
	Deformity of yolk		+	+	+
	Growth retardation ^f		+	+	+

^a No clear organ structures are recognized.

^b Malformation of tail was assessed when the tail was bent.

^c Malformation of the end tail was assessed when the spike was bent or twisted.

^d Malformation of sacculi/otoliths cover formation of no, one or more than two otoliths per sacculus as well as include absence or abnormally shaped sacculi (vesicles).

^e Malformation of heart was assessed when the two chambers were not placed side by side, or when the chambers showed an abnormal shape.

^f Growth retardation was assessed in comparison to the control embryos.

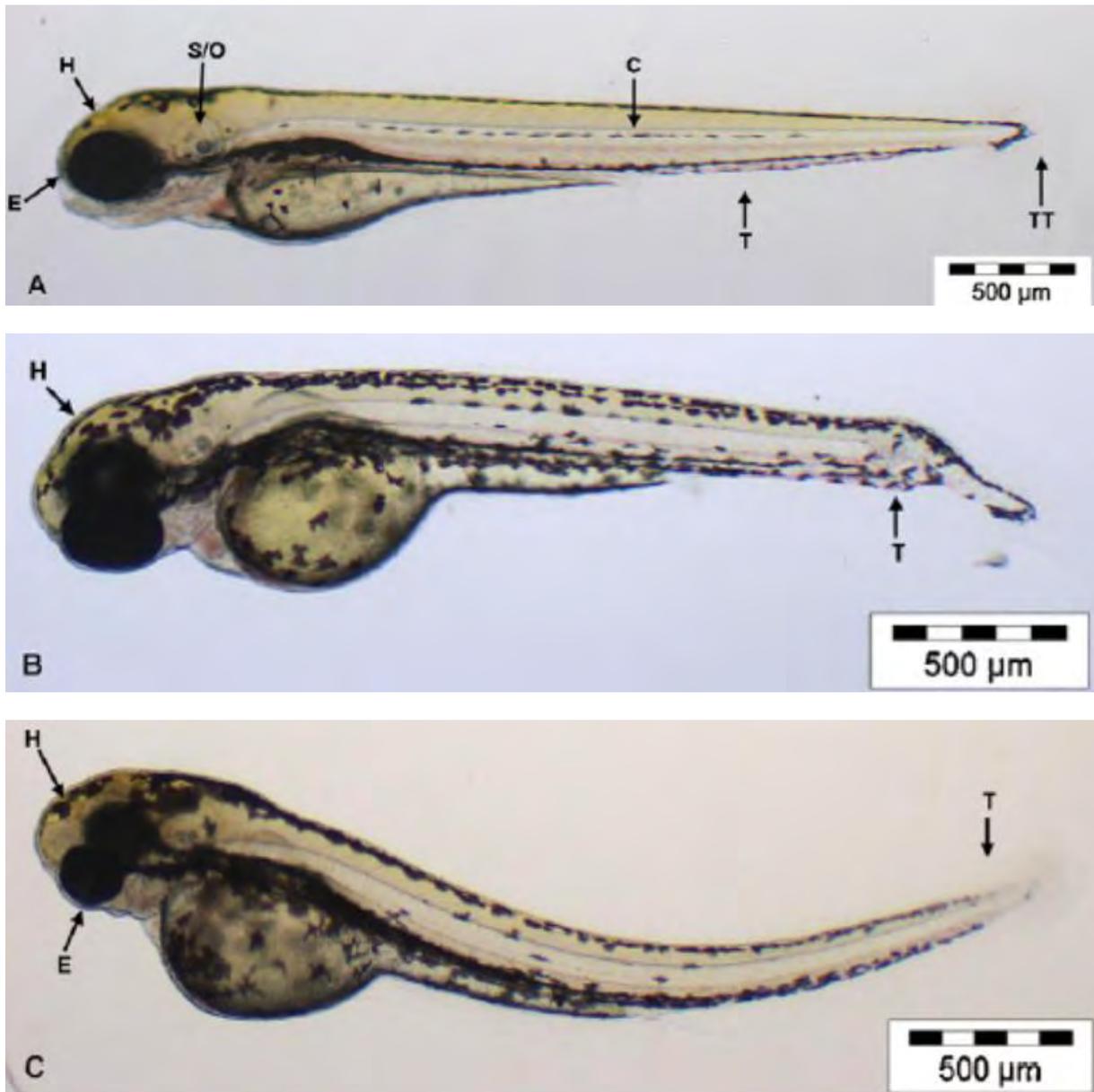


Abb. 49: Im Gegensatz zu 3 Tage alten Kontrollembryonen des Zebrafärblings (*Danio rerio*; A) zeigen Embryonen, die 200 µM Coumestrol (B) bzw. 125 µM Warfarin exponiert wurden, massive Fehlbildungen im Bereich des Kopfes, Auges und Schwanzes.

Für die Diskussion zum Fischembryotoxizitätstest können folgende Aussagen getroffen werden:

- (1) Cytochrom P450 kann bereits in 8 h alten Embryonen des Zebrafärblings nachgewiesen werden – und dies nicht nur als mRNA, sondern als enzymatisch aktives Protein.
- (2) Die Trennung von konstitutiv deprimiertem Cytochrom P450 1B1 von induzierbarem Cytochrom P450 1A ist in sehr frühen Stadien des Zebrafärblingsembryos schwierig.
- (3) Ein erstes Maximum der Induzierbarkeit von Cytochrom P450 wird im Embryo des Zebrafärblings in einem Alter von 72 h erreicht, wenn die Leber ihre volle Funktionsfähigkeit erreicht hat.

- (4) Der *In vivo*-EROD-Assay ist so empfindlich, dass auch eine konzentrations- und dauerabhängige Überstimulation des Cytochrom P450-Systems gezeigt werden kann.
- (5) Trotzdem kann die Effektivität der Bioaktivierung durch Zugabe externer Metabolisierungssysteme (S9-Mix) gesteigert werden.
- (6) An ausgesuchten Beispielen kann gezeigt werden, dass Embryonen des Zebrafisches über ein breites Spektrum von Bioaktivierungsenzymen im Bereich des Cytochrom P450-Systems verfügt, so dass eine Vielzahl unterschiedlicher Proteratogene zu den aktiven (teratogenen) Metaboliten umgesetzt werden können.

Anhänge

- Anhang 1: Standard Operation Procedure (SOP) Fish Embryo Test
- Anhang 2: Report OECD-Validierung Fischembryotest Phase 1
- Anhang 3: Bericht zur Statistik zum Draft Report OECD-Validierung Fischembryotest
- Anhang 4: Draft Report OECD-Validierung Fischembryotest Phase 2
- Anhang 5: Ruben Strecker 2008 Untersuchungen zum Sauerstoffbedarf des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) im Sedimentkontakttest. Diplomarbeit Universität Heidelberg
- Anhang 6: Strecker, R., Seiler, T.B., Hollert, H., Braunbeck, T. (2011) Oxygen requirements of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. *Comp. Biochem. Physiol.* 153 C: 318-327
- Anhang 7: Draft Report OECD-Validierung Fischembryotest Phase 2
- Anhang 8: 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. *Reprod. Toxicol.* 33(2):245-253
- Anhang 9: Frauke Fedderwitz (2008) Morphologie und Ultrastruktur des Chorions vom Zebraäbrbling (*Danio rerio*). Bachelorarbeit, Universität Heidelberg
- Anhang 10: Britta Kais (2009) The distribution of different fluorescence dyes in the egg and embryo of the zebrafish (*Danio rerio*) Diplomarbeit, Universität Heidelberg
- Anhang 11: Henn, K., Braunbeck, T. (2010) Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol.* 153C: 91-98
- Anhang 12: Kais, B., Keiter, S., Schneider, K.E., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T. (2012) DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion – implications for the fish embryo test (FET). *Comp. Biochem. Physiol.* eingereicht
- Anhang 13: Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendler, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. In Vitro* 23: 1436-1442
- Anhang 14: Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol.* 149C: 196-209
- Anhang 15: Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, R., Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species B an update. *ALTEX* 22: 87-102
- Anhang 16: Böhler, S. (2012) The fathead minnow embryo as a model for the development of alternative testing methods in ecotoxicology. Diplomarbeit, Universität Heidelberg
- Anhang 17: Otte, J., Schmidt, A., Hollert, H., Braunbeck, T. (2010) Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 100: 38-50

- Anhang 18: Weigt, S., Huebler, N., Braunbeck, T., von Landenberg, F., Broschard, T.H. (2010) Zebrafish teratogenicity test with metabolic activation (mDarT): Effects of phase I activation of acetaminophen on zebrafish *Danio rerio* embryos. *Toxicology* 275: 36-49
- Anhang 19: Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25-36
- Anhang 20: Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141