

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich – Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

M.Sc. Rebecca Sophia von Hellfeld

aus: Köln, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung: 03.08.2021



Die Anwendbarkeit des Zebra­bär­blings-Embryos (*Danio rerio*)  
als Modelorganismus in der Teratogenitätsforschung

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Braunbeck  
Prof. Dr. Stephan Frings



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Thomas Braunbeck, für sein Engagement und seine Unterstützung, sowie Prof. Dr. Stefan Frings und Prof. Dr. Thomas Rausch für ihren Input. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Graeme Paton, sich kurzfristig als Prüfer bereitzustellen. Ich danke den Mitarbeitern des EU-ToxRisk-Projekts, insbesondere Prof. Dr. Anna Forsby, Dr. Susanne Hougaard Bennekou, und Prof. Dr. Marcel Leist, für ihr Interesse an meiner Forschung. Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Lisa Baumann, die mich als Mentorin betreut hat.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle INF 504 und 232-ler (Dr. Annika Batel, Dr. Suse Knörr, Dr. Florian Zindler, Dr. Patrick Hinrich, Dr. Lisa Hanslik, Dr. Ann-Kathrin Lörracher, Lukas Frese, Lisa Gölz, Susanna Mieck, Carola Schuller, Nadine Kämmerer, Angie Moissl, Dr. Viktor Winter, Gabriele Günther und Dr. Frank Möhrle) für die herzliche Aufnahme und die vielen witzigen Mittagspausen und Weihnachtsfeiern, und dafür, dass sie diese Aufgabe ein wenig leichter gemacht haben. Danke, Viktoriia Ovcharova, für all die harte Arbeit während der Master-Arbeit, für die Akribie im Labor und in der Statistik. Ich möchte auch Dr. James Brand und Arielle Planchette für ihre Unterstützung danken. Danke, Katharina Brotzmann, EU-ToxRiskler-Kollegin und Egmond-Reisepartnerin, wir haben zusammen viel erlebt! Ein großes Dankeschön auch an Johannes, Nanette, Alice und alle weiteren EU-ToxRiskler, die die Treffen und Konferenzen im Laufe der Jahre immer wieder zu einem Erlebnis gemacht haben.

Ich möchte mich auch bei meiner Familie bedanken: bei meinen Eltern, dafür, dass sie mich immer "mein Ding machen lassen", und bei meinen Großeltern, für die tollen Gespräche, die wir geführt haben; das hat mich definitiv „nennenswert weitergebracht“! Und natürlich meine Freunde, die zu mir gehalten haben, als es etwas stressig wurde. Dafür, dass sie mich immer unterstützt haben, sonst hätte ich wahrscheinlich aufgegeben. Danke, an meine besten Freunde Arielle, Lisa, Kristina, James und die MER-Crew, dass ihr mich bei Verstand gehalten habt. Ihr habt keine Ahnung, wie sehr ihr mir beim Überleben geholfen habt. Ich schulde euch einen (...ok gut, vielleicht auch mehr als einen)! Und zu guter Letzt muss ich auch meinem Freund Chris dafür danken, dass er es mit mir während meiner Promotion ausgehalten hat. Danke für die ständige Unterstützung, dafür, dass du mir gesagt hast, dass alles gut wird, dafür, dass du mir ein paar Mal den Hintern gerettet hast, und dafür, dass du mit mir eine Pandemie durchgestanden hast, ohne zu versuchen, mich umzubringen.

Und schließlich, auch wenn Sie nicht dabei sein kann, verdanke ich das meiste meiner besten Freundin, Veerle. Ich wünschte, du könntest das Sehen und diesen Meilenstein mit mir feiern.



## Förderung

Diese Arbeit wurde mit Mitteln aus dem Forschungs- und Innovationsprogramm Horizon 2020 der Europäischen Union unter der Förderungsvereinbarung Nr. 681002 (EU-Tox-Risk) gefördert.



## Zusammenfassung

Ereignisse wie die Minamata-Methylquecksilberkatastrophe und der Contergan-Skandal haben den Fokus verstärkt auf die Entwicklung von Protokollen zur Risikobewertung von chemischen Stoffen gelenkt. Um solchen Forderungen Folge zu leisten, wurden vermehrt *In vivo*-Toxizitätstests mit den klassischen Säugetiermodellen, beispielsweise der Ratte (*Rattus norvegicus*) und der Maus (*Mus musculus*), entwickelt. Die Zulässigkeit dieser Tests wurde wiederum häufiger in Frage gestellt, wodurch die Suche nach neuen Testsystemen zur Verfeinerung und Verbesserung des bisherigen Katalogs an *In vivo*-Methoden begann. Das Ziel war es, die Unsicherheit der Daten zu reduzieren und letztendlich genauere Vorhersagen für die menschliche Gesundheit zu ermöglichen. Oftmals setzen Teratogenitätstests in frühen Entwicklungsstadien eines Organismus an, da diese zu den empfindlichsten Stadien zählen, welche durch Chemikalien und äußere Einwirkungen gestört werden können. Der Embryo des Zebraärbings (*Danio rerio*) beweist in dem Zusammenhang großes Potential, da er neben einer Fülle an Vorteilen im Blick auf die Aufzucht und Anwendbarkeit im Labor auch als alternatives Testsystem gilt, da der Organismus bis 120 Stunden nach der Befruchtung nicht unter die aktuellen EU-Tierschutzbestimmungen fällt. Doch trotz dieser Vorzüge ist die Anwendbarkeit des Zebraärbings in Teratogenitätstests noch immer nicht vollständig akzeptiert.

Diese Dissertation hat das Ziel, festzustellen, inwieweit der Zebraärbings-Embryo für allgemeine Teratogenitätstests eingesetzt werden kann. Hierzu wurde er zunächst im „Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test“ (OECD TG 236) auf seine Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen entwicklungs- und reproduktionstoxischen Substanzen getestet. Diese Ergebnisse ermöglichten die Bestimmung einer umfangreichen Liste von phänotypischen Entwicklungsveränderungen, von denen einige zur Prüfung spezifischer Toxizitätsmechanismen weiterverwendet wurden. Substanzen, welche im FET-Test beispielsweise einen Tremor auslösten, wurden im Coiling- und im Schwimmverhaltens-Assay analysiert, um ihre Auswirkungen auf die Verhaltensentwicklung des Embryos zu bestimmen.

Die hier vorgestellten Befunde zeigen, dass der Zebraärbings-Embryo für Teratogenitätstests grundsätzlich geeignet ist und dass, obwohl die Testmethoden weitere Entwicklung erfordern, der Organismus Einblicke in die frühen morphologischen und neuronalen Entwicklungsveränderungen bietet. Die umfangreiche Liste an Beobachtungen im FET-Test erlaubt es in vielen Fällen, die diesen Veränderungen zugrundeliegenden Wirkmechanismen zu identifizieren. Die Verhaltensexperimente verdeutlichen außerdem, dass der Zebraärbing auf neurotoxische Wirkstoffe in verschiedenen Entwicklungsstadien reagiert, was sich durch spezifische Veränderungen der Verhaltensmuster zeigt. In Anbetracht der hier vorgestellten Daten empfiehlt sich der Zebraärbings-Embryo als effektives Modell in Teratogenitätsstudien. Im FET-Test und den Verhaltensexperimente wurden für den Menschen schädliche Substanzen erkannt und stellen im Vergleich zu den traditionellen Tierversuchen eine schnellere, einfacherer und schmerzfreie „*In vitro*“-*In vitro*-Methode dar.



## Abstract

Incidents, such as the Minamata methylmercury disaster and the thalidomide scandal, have increased the focus on the development of risk assessment protocols. In response, more *in vivo* toxicity tests have been developed using classical mammalian models, such as the rat (*Rattus norvegicus*) and the mouse (*Mus musculus*). The admissibility of these tests, in turn, was increasingly questioned, prompting the search for new test systems to refine and improve the previous catalogue of *In vivo* methods. The goal was to reduce the uncertainty of the data and ultimately enable more accurate predictions for human health. Teratogenicity testing assesses early developmental stages of an organism, as these are among the most sensitive stages that can be disrupted by chemicals and other substances. The zebrafish embryo (*Danio rerio*) has proven to hold great potential, as it offers a wealth of advantages in terms of rearing and applicability in the laboratory, as well as being an alternative test system, as the organism is not subject to current EU animal welfare regulations until 120 hours post fertilisation. However, despite these advantages, the applicability of the zebrafish in teratogenicity testing has not yet been definitively decided.

The present doctoral thesis aims to determine the extent to which the zebrafish embryo can be used for general teratogenicity testing. To this end, various developmental and reproductive toxicants were tested in the "Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test" (OECD TG 236), in order to determine its overall sensitivity. These results allowed the determination of an extensive list of macroscopic developmental changes, some of which were further used to test specific toxicity mechanisms. Substances that induced tremor in the FET assay, for example, were analysed in the spontaneous movement assay and swimming behaviour assay to determine their effects on embryo behavioural development.

The results presented here demonstrate that the zebrafish embryo is suitable for teratogenicity testing and that, although the methods require further development, the organism provides insight into early morphological and neural developmental changes. The extensive list of observations in the FET test allows in many cases to attribute the mechanisms of action underlying these changes. The behavioural experiments also illustrate that zebrafish respond to neurotoxic agents at different developmental stages, as evidenced by specific changes in behavioural patterns.

In view of the data presented here, the zebrafish embryo proves to be an effective model in teratogenicity studies. The FET test and behavioural experiments have identified substances harmful to humans and provide a faster, simpler, and painless *in vitro* method compared to traditional animal testing.



# Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1. Einleitung	1
1.1 Die Problematik der Wasserverschmutzung	1
1.2 Die Teratogenitätsforschung	2
1.2.1 <i>In vivo-</i> versus <i>In vitro</i> -Teratogenitäts-Modelle	3
1.3 Der Zebrabärblings-Embryo: Ein Favorit unter den Alternativmethoden	4
1.3.1 Der “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” als Teratogenitätstest	5
1.3.2 Entwicklungsbedingte Neurotoxizität im Zebrabärblings-Embryo	6
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	8
Kapitel 2. Material und Methoden	9
2.1 Chemikalien	9
2.1.1 Entwicklungsschädigende Substanzen diverser chemischer Klassen	9
2.1.2 Neuronalentwicklung-schädigende Substanzen (Neonicotinoide)	9
2.2 Experimentelle Methoden	10
2.2.1 Tierhaltung	10
2.2.2 Der FET-Test (OECD TG 236)	10
2.2.3 Der Coiling-Assay	11
2.2.4 Der modifizierte Coiling-Assay mit räumlich getrennten Embryonen	12
2.2.5 Der Schwimmverhaltens-Assay	13
2.2.6 Analyse der Neonicotinoid-Wasserproben (durch CyproTex)	14
2.3 Datenanalyse	14
2.3.1 Auswertung des FET-Tests	14
2.3.2 Auswertung des Coiling-Assays	15
2.3.3 Auswertung des Schwimmverhaltens-Assays	15
2.3.4 Auswertung der chemischen Analysen der Neonicotinoid-Wasserproben (durch CyproTex)	16
Kapitel 3. Die Ergebnisse der FET-Tests mit Substanzen diverser chemischer Klassen	17
3.1 Die Beobachtung spezifischer und unspezifischer Endpunkte des FET-Tests	17
3.1.1 Akute und subletale Toxizität der Substanzen	19
3.1.2 Die Normalentwicklung des Zebrabärblings-Embryos	27
3.1.3 Entwicklungsstörungen im Zebrabärblings-Embryo	32
3.2 Die Suche nach einem „Endpunkte-Fingerprint“ im FET-Test am Beispiel von Substanzen diverser chemischer Klassen	41
3.2.1 Unterschiede in der Schwere und/oder Häufigkeit der im FET-Test beobachteten Endpunkte	42
3.2.3 Die zeitabhängige Toxizität von Acrylamid und Colchicin	48
3.2.4 Beispiele für einen „Endpunkte-Fingerprint“ im FET-Test	49
3.3 Der Vergleich des FET-Tests mit <i>In vitro</i> -Testsystemen in Bezug auf Substanzen diverser chemischer Klassen	51

3.3.1 Die <i>In vitro</i> -Methoden	51
3.3.2 Die subletale Toxizität der Substanzen in allen Testsystemen	53
3.3.3 Unterschiede in der Toxizität der Substanzen im FET-Test und den <i>In vitro</i> -Assays	58
3.4 Die Empfindlichkeit des Coiling-Assays für die potenziell neurotoxischen Substanzen	61
3.4.1 Der Nachweis von Neurotoxizität im Coiling-Assay	62
3.5 Der Einfluss verschiedener Aufzuchtichten auf das Coiling-Verhalten	69
3.5.1 Worauf beruht die pränatale Kommunikation zwischen Zebrafisch-Embryonen?	71
Kapitel 4. Die Ergebnisse der FET-Tests und zweier Verhaltens-Assays mit Neonicotinoiden und Nikotin	74
<hr/>	
4.1 Die Ergebnisse der Wasserprobenanalyse	75
4.2 Die Auswirkung der Neonicotinoide auf die im FET-Test beobachteten Endpunkte	75
4.3 Die Auswirkungen der Neonicotinoide auf das Coiling-Verhalten	77
4.4 Die Auswirkung der Neonicotinoide auf das Schwimmverhalten	83
4.5 Der Vergleich der Neonicotinoid-Auswirkungen auf den Zebrafisch-Embryo mit den Reaktionen in anderen Säugetiermodellen	85
Kapitel 5. Wie vergleichbar sind Teratogenitätstests mit dem Zebrafisch-Embryo und <i>In vivo</i> -Säugetier-Modellen?	91
<hr/>	
5.1 Einige der klassischen <i>In vivo</i> -Säugetiermodelle	91
5.1.1 Wie präzise prognostizieren diese <i>In vivo</i> -Methoden Teratogenität bei Menschen?	94
5.2 Der Zebrafisch	95
5.2.1 Wie präzise prognostiziert der Zebrafisch Teratogenität bei Säugetieren?	97
5.3 Kann der Zebrafisch Teratogenität beim Menschen prognostizieren?	99
Chapter 6. Fazit: Ist der Zebrafisch-Embryo ein geeignetes Modell für Teratogenitätstests?	101
<hr/>	
Ausblick	103
Bibliographie	105
Annex	146





# Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung (auf Englisch)</b>
2,4-DNP	2,4-Dinitrophenol
3,4-DCA	3,4-Dichloranelin
AChE	Acetylcholinesterase
ADME	Adsorption, distribution, metabolism, and excretion
AE	Aerosol
AFT	Acute fish toxicity
AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AIB	$\alpha$ -Aminobuttersäure
ANOVA	Analysis of variance
AOP	Adverse outcome pathway
AP	Aktivatorprotein 1 pathway
AR	Androgen
BMC	Benchmark Konzentration
BMR	Benchmark Reaktion
BSM	Binary solvent manager
CarE	Carboxylesterase
CAT	Catalase
cMINC	Circular migration zone NCC function
COX	Cyclooxygenases
CYP 450	Zytochrom P450
DA	Dopamine
DART	Developmental and reproductive toxicity
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
dM	Deformed muscle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNOC	Dinitro- <i>o</i> -cresol
DNT	Developmental neurotoxicity
DPF	Days post fertilisation
EC	Effect concentration
ECHA	European Chemicals Agency
ECVAM DB-AM	European centre for the validation of test methods database on alternative methods to animal experimentation
ERa	Östrogen
ERC	Environmentally relevant concentration
ERSE	Endoplasmatischer Retikulum Stress-Signalweg
F	Notochord fracture
FET	Fish embryo acute toxicity

FI	Fold induction
GABA	$\gamma$ -Aminobutyric acid
GD	Gestational day
GR	Glutathione
GSSG	Oxidised glutathione
GST	Glutathione-S-transferase
HDAC	Histone deacetylases
HepG2	Liver hepatocellular carcinoma
HEK 293	Human embryonic kidney 293
HH	Hamburger-Hamilton stage
HPF	Hours post fertilisation
ICH S5(R3)	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use document 'guideline on reproductive toxicology: Detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals – step 5, revision 3'
iNC	Internal negative control
iPSC hep	Induced pluripotent stem cells derived hepatocytes
JRC	Joint research centre
kDa	kiloDalton
LC	Lethal concentration
LC-MS/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
LDT	Light-dark test
LOD	Limit of detection
LOEC	Lowest observed effect concentration
LR	Likelihood ratio
MDA	Malondialdehyde
MO	Morpholino oligonucleotides
MPP+	1-Methyl-4-phenyl-pyridinium iodide
nAChR	Nicotinic acetylcholinesterase receptor
NCC	Neural crest cell migration
NeuriTox	Neurite outgrowth toxicity
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartic acid
NO(A)EC	No observed (adverse) effect concentration
Nrf2	Oxidativer Stress-Reaktionsweg nfr-2
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory medication
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
P21	Cyclin-dependent kinase-inhibitor protein 21
P53	Protein 53
PC	Positive concentration
PCB 180	Polychlorinated biphenyl 180
PE	Pericardial oedema
PND	Postnatal day

POD	Peroxidase
POP	Persistent organic pollutant
PPAR	Peroxisom-Proliferator aktivierter Rezeptor
PR	Progesterone
PTU	1-Phenyl-2-thiourea
PXR	Pregnan X receptor
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
REACH	Registration, evaluation, authorisation, and restriction of chemicals
ROS	Reactive oxygen species
RPTEC/TERT1	Renal proximal tubule epithelial cells/telomerase reverse transcriptase catalytic subunit 1
RT	Room temperature
SC	Step change
SOD	Superoxide dismutase
SOP	Standard operating procedure
STS	Natrium tetradecyl sulphate
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TCF	Wnt signaling pathway
TG	Test guideline
TH	Tyrosine hydroxylase
TR $\beta$	Thyroid receptor
TS	Tobacco smoke
VSRA	Vibrational startle response assay
VTG	Vitellogenin
WSC	Worst case scenario
YE	Yolk oedema
YS	Yolk sac



## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1. Der Aufbau und Ablauf des FET-Tests, sowie Beispiele für Endpunkte und das Entwicklungsstadium zu jedem Auswertungs-Zeitpunkt des Assays 11
- Abbildung 2. Der Aufbau und Ablauf des Coiling-Assays sowie der Lichtzyklus, analysierte Endpunkte, und Auswertungsbeispiele 12
- Abbildung 3. Belegung der 24-Well Platten für die zusammen und separat aufgezogenen Embryonen im Coiling-Assay. Die erste Spalte an Wells (schwarz) konnte wegen der Kameraeinstellung nicht verwendet werden, alle weiteren Farben stellen verschiedene Lösungen dar 13
- Abbildung 4. Aufbau und Ablauf des Schwimmverhaltens-Assays sowie der Lichtzyklus und analysierte Endpunkte. 13
- Abbildung 5. Normalentwickelter Zebrabärblings-Embryo nach 24 hpf 27
- Abbildung 6. Normalentwickelter Zebrabärblings-Embryo nach 48 hpf 28
- Abbildung 7. Normalentwickelter Zebrabärblings-Embryo nach 72 hpf 29
- Abbildung 8. Normalentwickelter Zebrabärblings-Embryo nach 96 hpf 30
- Abbildung 9. Normalentwickelter Zebrabärblings-Embryo nach 120 hpf 31
- Abbildung 10. OECD TC 236 Kernendpunkte. **A:** Gastrulationsstillstand nach 24 hpf, 16 mg/l Hexachlorophen. **B:** Koagulation eines befruchteten Embryos nach 24 hpf, 4 mg/l 3,4-DCA. **C:** Späte Koagulation nach 96 hpf, 40 µg/l Colchicin. **D:** Geringfügig reduzierte Schwanzablösung nach 24 hpf, 9 mg/l 2-Propylheptansäure. **E:** Kaum abgelöster Schwanz nach 24 hpf, 116 mg/l 2-Ethylbuttersäure. **F:** Keine Schwanzablösung nach 24 hpf, 43 mg/l 2-Propylheptansäure. **G:** Reduzierte Somitenbildung (dM) nach 48 hpf, 15 mg/l Carbaryl. **H:** Notochord-Bruch (F) und dM nach 120 hpf, 7 mg/l 2-Methylpentansäure 33
- Abbildung 11. Subletale Endpunkte mit Regenerationspotenzial. **A:** Blutstau am Dotter und an den Perikarödemen nach 48 hpf, 52 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **B:** Blutstau am Dotter, und Dotter- und Perikardödemen nach 72 hpf, 46 mg/l 2-Ethylbuttersäure. **C:** Perikardödeme und fehlende Herzschleife nach 96 hpf, 13 µg/l Zinkpyrithion. **D:** Perikardödeme nach 96 hpf, 13 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **E:** Perikard- und Dotterödeme nach 96 hpf, 73 mg/l Hexansäure. **F:** Schwanzödeme nach 96 hpf, 73 mg/l Hexansäure 34
- Abbildung 12. Subletale Endpunkte mit geringem/keinem Regenerationspotential. **A:** Lordose nach 120 hpf, 58 mg/l Valproinsäure. **B:** Kyphose nach 72 hpf, 200 µg/l 2-Ethylhexansäure. **C:** Skoliose nach 120 hpf, 104 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **D:** Schwanzflossen ausfransen nach 96 hpf, 70 mg/l 2-Methylpentansäure. **E:** Deformierte Schwanzflosse nach 120 hpf, 9 mg/l 2-Propylheptansäure. **F:** Fehlendes Auge nach 72 hpf, 52 mg/l 4-Pentensäure. **G:** Stark reduzierte Augenentwicklung nach 72 hpf, 285 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **H:** Deformierte und reduzierte Otolithenbildung nach 96 hpf, 13 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **I:** Kieferdeformation nach 120 hpf, 58 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **J:** Kieferverformung nach 120 hpf, 17 mg/l 2-Propylheptansäure 37
- Abbildung 13. Seltene subletale Endpunkte. **A:** Dotterverformung nach 48 hpf, 58 mg/l Valproinsäure. **B:** Dotterverformung nach 120 hpf, 91 mg/l 4-Pentensäure. **C:** Reduzierte Dotterresorption und -verfärbung nach 120 hpf, 29 mg/l Valproinsäure. **D:** Vollständiges Fehlen der Körperpigmentierung mit pigmentierten Augen nach 96 hpf, 500 mg/l Paracetamol. **E:** Fehlen der Pigmentierung nach 120 hpf, 14 mg/l Valproinsäure. **F:** Fehlen der Pigmentierung im Kraniofazialbereich nach 72 hpf, 58 mg/l Valproinsäure. **G:** Notochorddeformation nach 24 hpf, 6 µg/l Zinkpyrithion. **H:** Notochorddeformation und Bruch nach 96 hpf, 13 µg/l Zinkpyrithion 39
- Abbildung 14. Zeitabhängige Toxizität von Acrylamid (links) und Colchicin (rechts) in Zebrabärblings-Embryonen bis 96 hpf gemäß OECD TG 236 (n=4). Kleinbuchstaben:

- statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten (a:  $p=0,034$ ; b:  $p=0,019$ );  
Gleiche Großbuchstaben: kein statistisch signifikanter Unterschied 48
- Abbildung 15. Radiales Balkendiagramm der FET-Test  $BMC_{10}$  Werte  $[-\text{Log}[M]]$ . Grün: aufgrund von Löslichkeitsgrenzen werden keine Daten präsentiert; Rot: Substanz wurde in diesem Assay nicht getestet. Die Farbe(n) der Balken geben Aufschluss über beeinträchtigte Organe, für Substanzen mit mehr als einem Anwendungsbereich/Zielorgan gelten mehrere Farben 55
- Abbildung 16. Radiale Balkendiagramme der cMINC Assay (Links) und NeuroTox Test (Rechts)  $BMC_{10}$  Werte  $[-\text{Log}[M]]$ . Die Farbe(n) der Balken geben Aufschluss über beeinträchtigte Organe, für Substanzen mit mehr als einem Anwendungsbereich/Zielorgan gelten mehrere Farben 56
- Abbildung 17 Radiale Balkendiagramme der RPTEC/TERT1 (Links) und HEK 293 (Rechts) Zellen- $BMC_{10}$  Werte  $[-\text{Log}[M]]$ . Rot: Substanz wurde in diesem Assay nicht getestet. Die Farbe(n) der Balken geben Aufschluss über beeinträchtigte Organe, für Substanzen mit mehr als einem Anwendungsbereich/Zielorgan gelten mehrere Farben 57
- Abbildung 18 Radiale Balkendiagramme der iPSC hep (Links) und HepG2 (Rechts) Zellen- $BMC_{10}$  Werte  $[-\text{Log}[M]]$ . Rot: Substanz wurde in diesem Assay nicht getestet. Die Farbe(n) der Balken geben Aufschluss über beeinträchtigte Organe, für Substanzen mit mehr als einem Anwendungsbereich/Zielorgan gelten mehrere Farben 58
- Abbildung 19. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von DMSO ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle 62
- Abbildung 20. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Acrylamid ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle 63
- Abbildung 21. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Ibuprofen ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle 64
- Abbildung 22. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Carbaryl ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle. Rot:  $\geq 20\%$  der Individuen mindestens einer Konzentrationsgruppe wurden von der Auswertung ausgeschlossen 65
- Abbildung 23. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Hexachlorphen ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle. Rot:  $\geq 20\%$  der Individuen mindestens einer Konzentrationsgruppe wurden von der Auswertung ausgeschlossen 66
- Abbildung 24. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Rotenon ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle. Rot:  $\geq 20\%$  der Individuen mindestens einer Konzentrationsgruppe wurden von der Auswertung ausgeschlossen 67

- Abbildung 25. Die Auswirkungen von Acrylamid (A, B), DMSO (C, D) und Ibuprofen (E, F) auf die Verhaltensänderung während des Lichzykluswechsels. Der Unterschied der mean-burst-duration [Sekunden] (A, C, E) und burst-count-per-minute (B, D, F) von 37 bis 38 hpf von Zebrafisch-Embryonen (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). Die Daten wurden als Differenz zwischen den beiden Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung berechnet. SC<sub>10</sub> und SC<sub>50</sub> geben einen Schwellenwert für 10 bzw. 50% Abweichung von den Kontrollen an 67
- Abbildung 26. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Rotenon (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle, *p*-Werte sind in Annex IV, Tabelle 1 gelistet 70
- Abbildung 27. Der mean-burst-duration [seconds] (A) und burst-count-per-minute (C) zwischen 21 und 47 hpf von Zebrafisch-Embryonen in Gegenwart von 0,1% DMSO (n=3, 20 Embryonen/Replikat, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Schwarz: Gruppenaufzucht; grau: Einzelaufzucht. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt mit signifikantem Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Man Whitney U-Test). Eine Tabelle mit allen signifikanten *p*-Werten befindet sich in Annex IV, Tabelle 2 71
- Abbildung 28. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Nikotin (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle 78
- Abbildung 29. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Thiaclopid (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle 79
- Abbildung 30. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Acetamid (n=4 (21-37 hpf) n=1 (38-47 hpf; Blau hinterlegt), 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle 80
- Abbildung 31. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Imidaclopid (n=4 (21-37 hpf) n=1 (38-47 hpf; Blau hinterlegt), 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle 81
- Abbildung 32. Mean-burst-duration [seconds] (A, C) und burst-count-per-minute (B, D) von 37 zu 38 hpf in Gegenwart von Nikotin (A, B) und Thiaclopid (C, D) (n=3, 20 Embryonen/Konzentration). Die Daten sind die Differenz zwischen den beiden Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung. SC<sub>10</sub> und SC<sub>50</sub>: 10 und 50% Abweichung der Werte von der Kontrollgruppe 82
- Abbildung 33. Mean-burst-duration [seconds] (A, C) und burst-count-per-minute (B, D) von 37 zu 38 hpf in Gegenwart von Acetamid (A, B) und Imidaclopid (C, D) (n=1, 20 Embryonen/Konzentration). Die Daten sind die Differenz zwischen den beiden Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung. SC<sub>10</sub> und SC<sub>50</sub>: 10 und 50% Abweichung der Werte von der Kontrollgruppe 83
- Abbildung 34. Die gruppierte zurückgelegte Gesamtdistanz [mm] (A), normalisierte Distanz (B), gruppierte Bewegungsfrequenz [n/15min] (C), und normalisierte Frequenz (D) zwischen 83 und 120 hpf in der Gegenwart von Acetamid (n=2, 19 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: Normalisiert zur Kontrolle. Balken:

Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle, alle p-Werte sind in Annex V, Tabelle 3 84

Abbildung 35. Die gruppierte zurückgelegte Gesamtdistanz [mm] (A), normalisierte Distanz (B), gruppierte Bewegungsfrequenz [n/15min] (C), und normalisierte Frequenz (D) zwischen 83 and 120 hpf in der Gegenwart von Nikotin (n=3, 19 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B and D: Normalisiert zur Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle 84

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Testkonzentrationen der DART-Substanzen [mg/l] im FET-Test, sowie das verwendete Medium und Lagertemperatur [°C] der Stammlösungen	18
Tabelle 2. Testkonzentrationen der weiteren-Substanzen [mg/l] im FET-Test, sowie das verwendete Medium und Lagertemperatur [°C] der Stammlösungen	18
Tabelle 3. Letale und subletale Toxizität [mg/l] der Substanzen im FET-Test, mit ToxRat® errechnet	20
Tabelle 4. Zusammenfassung der morphologischen Effekte im Zebrafisch-Embryo nach 96 hpf oder 120/144 hpf im FET-Test	24
Tabelle 5. Subletale und akute Toxizität [mg/l] ausgewählter Testsubstanzen (LC- und EC-Werte bei 10% und 50% Wirkungsgrad) im Zebrafisch-Embryo bei 96 hpf	41
Tabelle 6. Semi-quantitative Auswertung aller bei $\leq EC_{10}$ -Konzentrationen beobachteten Effekte in Zebrafisch-Embryonen, gruppiert in letale Wirkungen gemäß OECD TG 236 (OECD 2013), unspezifische Veränderungen, die bei den meisten Substanzen beobachtet wurden, sowie spezifischere Endpunkte, die bei $<4$ Substanzen beobachtet wurden. Substanzen alphabetisch geordnet (Beobachtungen aus $n=2$ unabhängigen Replikaten)	44
Tabelle 7. Semi-quantitative Auswertung aller bei $\leq EC_{50}$ -Konzentrationen beobachteten Effekte in Zebrafisch-Embryonen, gruppiert in letale Wirkungen gemäß OECD TG 236 (OECD 2013), unspezifische Veränderungen, die bei den meisten Substanzen beobachtet wurden, sowie spezifischere Endpunkte, die bei $<4$ Substanzen beobachtet wurden. Substanzen alphabetisch geordnet (Beobachtungen aus $n=2$ unabhängigen Replikaten)	45
Tabelle 8. Semi-quantitative Auswertung aller bei $\leq LC_{10}$ -Konzentrationen beobachteten Effekte in Zebrafisch-Embryonen, gruppiert in letale Wirkungen gemäß OECD TG 236 (OECD 2013), unspezifische Veränderungen, die bei den meisten Substanzen beobachtet wurden, sowie spezifischere Endpunkte, die bei $<4$ Substanzen beobachtet wurden. Substanzen alphabetisch geordnet (Beobachtungen aus $n=2$ unabhängigen Replikaten)	46
Tabelle 9. Semi-quantitative Auswertung aller bei $\leq LC_{50}$ -Konzentrationen beobachteten Effekte in Zebrafisch-Embryonen, gruppiert in letale Wirkungen gemäß OECD TG 236 (OECD 2013), unspezifische Veränderungen, die bei den meisten Substanzen beobachtet wurden, sowie spezifischere Endpunkte, die bei $<4$ Substanzen beobachtet wurden. Substanzen alphabetisch geordnet (Beobachtungen aus $n=2$ unabhängigen Replikaten)	47
Tabelle 10. $BMC_{10}$ [-Log[M]] aller Substanzen der verschiedenen Testsysteme des EU-ToxRisk Projektes	54
Tabelle 11. Testkonzentrationen [mg/l] des Coiling-Assays für die getesteten Substanzen	61
Tabelle 12. Testkonzentrationen von Nikotin und den Neonicotinoiden im FET-Test, Coiling Assay und basalem Schwimmverhaltens-Assay [mg/l]	74
Tabelle 13. Die mit ToxRat® berechneten $EC_{10}$ and $EC_{50}$ Mittelwerte für Nikotine und die Neonicotinoide [mg/l] ( $n=3$ )	76
Tabelle 14. Endpunkte in den FET-Tests mit Neonicotinoiden	77



# Kapitel 1. Einleitung

## 1.1 Die Problematik der Wasserverschmutzung

In der Vergangenheit kam es zu unkontrollierten und unbeabsichtigten Freisetzungen von Chemikalien, von denen sich später herausstellte, dass sie schädliche Auswirkungen auf Umwelt und Gesellschaft haben. Ein Beispiel ist Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), ein chlororganisches Pestizid, das erstmals 1939 entwickelt und als Moskitozid eingesetzt wurde (Martyniuk u. a., 2020). 1962 wurde jedoch die krebserregende Wirkung von DDT entdeckt (Smith, 1999) und Studien zeigten, dass die Aufnahme von DDT durch Vögel zu einer starken Ausdünnung der Eierschalen führte (Kolaja und Hinton, 1977), was sich negativ auf die Vogelpopulation auswirkte. DDT wurde verboten, jedoch erfolgte diese Handlung zu spät, denn DDT und andere Organochlorverbindungen sind hochpersistente Substanzen (auch bekannt als persistente organische Schadstoffe; POPs, aus dem Englischen: persistent organic pollutants), und können daher nicht vollständig aus der Umwelt entfernt werden und sind auch heute noch vorhanden (Thakur und Pathania, 2020). Außerdem reichern sich diese Stoffe in Fettgewebe an, da sie hoch lipophil sind (Martyniuk u. a., 2020), ein Effekt, der sich über das Nahrungsnetz verstärkt (Biomagnifikation). Um dies zu illustrieren: Obwohl fast kein direkter Einsatz chemischer Substanzen in der zirkumpolaren Arktis stattfand, wurden hohe Konzentrationen von Organochlorverbindungen im Fettgewebe von Eisbären (*Ursus maritimus*) gemessen (Dietz u. a., 2013; Letcher u. a., 2010).

Im Jahr 1956, nur wenige Jahre vor dem Verbot von DDT, wurden in Japan die ersten Fälle der später als Minamata-Krankheit bezeichneten Erkrankung registriert (Kitamura u. a., 2020). Eine Fabrik hatte mit ihrem Abwasser Quecksilbersulfat freigesetzt, welches von Bakterien im Sediment in Methylquecksilber umgewandelt wurde. Aufgrund seiner Lipophilie und seines geringen Molekulargewichts bioakkumulierte Methylquecksilber in Organismen in der Minamata-Bucht und der Shiranui-See, welche zu den Grundnahrungsmitteln der lokalen Bevölkerung zählten (Reis und Mizusawa, 2019). Eingelieferte Patienten zeigten Muskelschwäche, Taubheit in den Extremitäten, Seh- und Sprachstörungen und in schweren Fällen Lähmungen und Tod. Außerdem wiesen Kinder, welche später in der Region geboren wurden, schwere Geburtsfehler auf (Yorifuji, 2020). Solche Ereignisse haben zur Entwicklung des Forschungsgebiets der Umwelttoxikologie geführt, die die schädlichen Auswirkungen anthropogener Stoffe auf lebende Organismen bewertet (Laws, 2013), und der Ökotoxikologie, die diese potenziellen schädlichen Auswirkungen auf Populations- und Ökosystemebene ermittelt (Newman und Clements, 1998).

277.8 Millionen Tonnen gefährlicher Chemikalien wurden 2019 allein in der Europäischen Union produziert (Eurostat, 2020). Die meisten anthropogenen Substanzen und ihre Metaboliten gelangen schließlich in die Umwelt, meist durch unbeabsichtigte oder falsche Verwendung, unkontrollierte Entsorgung oder unvollständige Eliminierung (Andreozzi u. a., 2003; Schock u. a., 2012), welches zu einer Kontamination des Wassersystems führt

(Küster und Adler, 2014). In einer Studie des deutschen Umweltbundesamtes wurden 156 Arzneimittel in Wasserproben gemessen (Küster und Adler, 2014), darunter auch solche, die das endokrine System beeinflussen (Jálová u. a., 2013) und (teilweise metabolisierte) Arzneimittel (Kümmerer, 2009). Das Vorhandensein solcher Chemikalien im Wasser kann auch nachteilige Auswirkungen auf das aquatische Ökosystem haben, da sie auf Populationsebene Effekte hervorrufen können. Dazu gehören zum Beispiel die Verweiblichung ganzer Population durch östrogenhaltige Pharmazeutika (Dang und Kienzler, 2019; Matthiessen u. a., 2018; Wolf und Wheeler, 2018), oder durch neuroaktive Substanzen induzierte Verhaltensänderungen, die das Überleben beeinträchtigen (De Esch et al., 2012; Dhillon et al., 2015; Green und Planchart, 2018; Nishimura et al., 2016; Yueh und Tukey, 2016). Als Versuch, diese Probleme zu lösen, wurden Richtlinien wie REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, EC1907/2006 (EU, 2007)) und die europäische Kosmetikrichtlinie (EC, 2009) ins Leben gerufen. Abhängig von der jährlich registrierten Menge einer Chemikalie verlangt die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) nun beispielsweise die Bewertung der externen Belastung sowie der kurz- und langfristigen Exposition und der potenziellen Auswirkungen auf die Entwicklung (Teratogenität) und das Wachstum in Wirbeltier- und Nicht-Wirbeltiermodellen, um die Anforderungen von REACH zu erfüllen (EU, 2007).

## 1.2 Die Teratogenitätsforschung

Die Mehrzahl der frühen Embryologie-Studien wurde mit Seeigeln, Küken und Amphibien durchgeführt, sie lieferten Einblicke in die Entwicklungsstadien und die Organdifferenzierung der Tiere (Garry und Truran, 2017). Solche Studien ermöglichten auch die Beobachtung, dass die Belastung mit bestimmten Substanzen die Entwicklungsprozesse dieser Tiere beeinflusste (Cook und Fairweather, 1968). Heutige Teratogenitätstests wurden jedoch erst wirklich entwickelt, nachdem festgestellt wurde, dass Thalidomid, ein Arzneimittel, das ursprünglich zur Linderung von Angstzuständen, Schlaflosigkeit und morgendlicher Übelkeit gedacht war, zwischen 1959 und 1961 bei mehr als 12.000 Neugeborenen schwere Skelettfehlbildungen und Herzmissbildungen hervorrief (DeSesso, 2017; Ujházy u. a., 2012). Dies untermalte die Notwendigkeit, das Potenzial einer Substanz zur Beeinflussung der Embryonalentwicklung (Alwan und Chambers, 2015) sowie späterer Entwicklungsstadien (z. B. der Pubertät; Rogers und Kavlock, 1996) zu testen. In modernen Teratogenitätstests werden die Auswirkungen auf die Fertilität und die prä-/postnatale Entwicklung einschließlich morphologischer, zellulärer und molekularer Veränderungen sowie das Überleben von Individuen in der embryofötalen Entwicklung bewertet (Barrow, 2013). Solche Tests befassen sich mit der gesamten Entwicklungs- und Reproduktionstoxizität (DART, aus den englischen: developmental and reproductive toxicity) eines Wirkstoffs oder mit spezifischeren Veränderungen wie der (Entwicklungs-)Neurotoxizität ((D)NT).

DART-Tests bewerten die potenzielle Schädigung, welche in kritischen Phasen der Empfängnis (d. h. Auswirkungen auf die Fortpflanzungsfähigkeit und den Fortpflanzungserfolg), während der Schwangerschaft, und in der postnatalen Entwicklung hervorgerufen

werden. Solche Effekte können von Entwicklungsanomalien über molekulare und genetische Veränderungen bis hin zum Tod reichen (Duong u. a., 2011; Jamkhande u. a., 2014). Die ersten Prüfrichtlinien (TGs, aus dem Englischen: test guidelines) zu DART für Industriechemikalien wurden in den 1980er Jahren von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD, aus dem Englischen: Organisation for Economic Co-operation and Development) veröffentlicht, die In vivo-Teratogenitäts-Effekte in verschiedenen Modellorganismen untersuchten (OECD, 1981a). Es folgte die "Guideline on Reproductive Toxicology" des International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: Detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals - step 5" (ICH S5) für Pharmazeutika in den 90er Jahren, welches Empfehlungen zur Prüfung der Reproduktionstoxizität von Substanzen enthält, einschließlich der bis dahin häufig vernachlässigten Untersuchung von Effekten auf die männliche Fertilität (ICH, 1993). DNT hat zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen, da das Gehirn ein hochplastisches Organ ist, das während der Entwicklung besonders anfällig für Störungen ist (Selderslaghs u. a., 2010). Das gilt auch für das sich entwickelnde Nervensystem, welches chronische Schädigungen davontragen kann (Garry und Truran, 2017). Eine besondere Herausforderung der DNT-Bewertung besteht darin, dass die durch Entwicklungsneurotoxine verursachten Effekte möglicherweise nicht während oder unmittelbar nach der Belastung sichtbar werden. Bei einigen Chemikalien wurde beispielsweise festgestellt, dass sie zu Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer beitragen, die erst später im Leben erkennbar werden (Giordano und Costa, 2012). Darüber hinaus wurde die Störung der Bildung und Migration von Neuralleistenzellen (NCCs, aus dem Englischen: neuronal crest cells), die die Bausteine des Nervensystems und der Craniofazialen Strukturen sind, häufig in DNT- und DART-Tests untersucht (Nyffeler u. a., 2017a). Es wurde festgestellt, dass beispielsweise nicht-planare polychlorierte Biphenyle (PCBs) (Nyffeler u. a., 2018) und Ketamin (Shi u. a., 2018) die an der Migration, Differenzierung und Proliferation von Neuralleistenzellen beteiligten Signalwege negativ beeinflussen, was zu einer Vielzahl von Entwicklungsanomalien führt (Zimmer u. a., 2012).

### 1.2.1 *In vivo- versus In vitro*-Teratogenitäts-Modelle

Bei Teratogenitätstests bieten *In vitro*-Methoden den Vorteil, dass sie kosten- und zeiteffizienter sind, von geschultem Personal leichter durchgeführt werden können und im Vergleich zu klassischen *In vivo*-Testsystemen eine höhere Durchsatzeffizienz (Schumann, 2010). Da sie dem "replace, reduce and refine"-Konzept des 3R-Prinzips (Russell und Burch, 1959), entsprechen, finden *In vitro*-Tests zunehmend Anwendung in allen Bereichen der wissenschaftlichen Forschung, obwohl sie komplexe organismische Prozesse wie Adsorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung (ADME, aus dem Englischen: adsorption, digestion, metabolism and excretion) nicht berücksichtigen können. Assays zur Untersuchung von Effekten, die in einem sich rapide entwickelnden Fötus mit sich kontinuierlich differenzierenden Zellen, basieren auf „whole-embryo-cultures“, micromass Teratogentests oder embryonalen Stammzellen (Schumann, 2010). Da *In vitro*-Assays je-

doch nur einen begrenzten Einblick in Veränderungen auf Organismus Ebene bieten, bleiben Daten aus klassischen *In vivo*-Assays, die auf Tiermodellen basieren, für die Toxizitätstests entscheidend (Lords, 2002).

In einem Versuch, die Notwendigkeit alternativer Methoden und die Vorteile von *In vivo*-Assays zu vereinen, fordert die ECHA als Teil der REACH-Politik die Nutzung von auf Tiermodellen basierenden Daten, um die Anzahl der verwendeten Individuen zu reduzieren, und fördert die zusätzliche Verwendung alternativer Methoden (ECHA, 2020). Die OECD-Leitlinien für die Prüfung von Chemikalien (OECD, 1981a) enthalten sieben akzeptierte und validierte Testmethoden zur Bewertung der Entwicklungstoxizität in *In vivo*-Tiermodellen. Bei vielen tiergestützten Teratogenitätstests werden trächtige Labortiere eingesetzt. Die pränatale Entwicklungstoxizität bei Nagetieren wird beispielsweise durch die Exposition trächtiger Nagetiere in der OECD TG 414 (OECD, 1981b) bewertet, während der 1-Generationen-Reproduktionstoxizitätstest den Reproduktionserfolg von Nagetieren bestimmt, die für mindestens einen Spermatogenese- bzw. zwei Östrus Zyklen exponiert wurden (OECD TG 415; OECD, 2019a). Der Reproduktions-/Entwicklungstoxizitätstest (OECD TG 421; OECD, 1995) bewertet darüber hinaus die Reproduktionsleistung bei Nagetieren über 63 Tage, einschließlich der Auswirkungen auf die F1 und F2 Generation. Diese Tests liefern zwar wichtige Erkenntnisse über die Toxizität der getesteten Chemikalien, sind aber sehr zeit- und kostenintensiv (Yamashita u. a., 2014). Dies gilt umso mehr für den Zwei-Generationen-Fortpflanzungstoxizitätstest (OECD TG 416; OECD, 1983), der auf der kontinuierlichen Verabreichung einer Substanz an zwei Generationen von Nagetieren basiert. Zudem bergen diese Tierversuche eine Fülle von (ethischen) Problemen, wie z. B. das Potenzial für unvermeidbares Leiden der Versuchstiere oder Stress, der abnormales Verhalten auslösen kann (Carbone, 2019; Cheluvappa u. a., 2017). In den letzten Jahren wurden daher vermehrt Nicht-Säugetiere in Teratogenitätstests einbezogen, was zur Entwicklung von neun OECD registrierten und akzeptierten *In vivo*-Teratogenitätstests führte. Dazu gehören der Akute Fischtoxizitätstest (AFT, OECD TG 203; OECD, 2019b), der zur Bestimmung der 50%igen Letalitätskonzentration nach 5 Tagen Belastung in Fischen verwendet wird, sowie der Fish Juvenile Growth Test (OECD TG 215; OECD, 2000), der über 28 Tage durchgeführt wird und morphologische Veränderungen während späterer Entwicklungsstadien feststellt. Da diese Assays jedoch nicht mit dem 3R-Prinzip (Burch und Russel, 1959) übereinstimmen, mussten neue Methoden entwickelt werden (Flint, 1993; Scholz u. a., 1999; Webster u. a., 1997), die eine Alternative für die Bewertung der Entwicklungstoxizität darstellen (Yamashita u. a., 2014), wobei ein Favorit der Zebraabärbling ist.

### 1.3 Der Zebraabärblings-Embryo: Ein Favorit unter den Alternativmethoden

Der Zebraabärbling (*Danio rerio*) aus der Familie der Karpfenfische, stammt ursprünglich aus indischen und südasiatischen Gewässern (Barros u. a., 2008; Eaton und Farley, 1974). Aufgrund seiner geringen Körpergröße, der kurzen Generationszeit, der durch das transpa-

rente Chorion beobachtbaren *Ex utero* Entwicklung, der kostengünstigen Haltung, der einfachen Manipulation durch genetische oder pharmakologische Methoden und der hohen genetischen und physiologischen Homologie zu Säugetieren (Brox u. a., 2016; Embry u. a., 2010; He u. a., 2014; Howe u. a., 2013; Pinho u. a., 2016) hat der Zebrafisch in verschiedenen Forschungsbereichen an Popularität gewonnen (Kalueff u. a., 2014; Teixidó u. a., 2019). In den 80er Jahren wurde er erstmals in der genetischen Forschung eingesetzt (Streisinger u. a., 1981) und findet seither Anwendung in teratologischen Studien, da er über eine zeitlich klar definierte Embryonalentwicklung verfügt, und dadurch genaue Zeitpunkte aufweist, welche die für organspezifische Untersuchungen von Interesse sind. Bereits 120 Stunden nach der Befruchtung (hpf, aus dem Englischen: hours post fertilisation) haben sich Organe und Gewebe entwickelt (He et al., 2014), die anatomische, physiologische, zelluläre und molekulare Ähnlichkeiten zu Säugetieren aufweisen (Menke u. a., 2011). Darüber hinaus verfügt der Zebrafisch über einen vergleichbaren Stoffwechsel, Sensorik, Signalwege und kognitives Verhalten (De Esch u. a., 2012). Die exogene Fütterung beginnt in der Regel 6 Tage nach der Befruchtung (dpf, aus dem Englischen: days post fertilisation), welcher Veränderungen der Craniofazialen Strukturen und eine bakterielle Besiedlung des voll entwickelten Gastrointestinaltraktes vorausgehen. Ab 6 dpf sind die Organe bereits voll entwickelt, der Dottersack sollte fast vollständig resorbiert sein, und die Schwimmblase wird sichtbar. Außerdem wird die Pigmentierung deutlicher.

Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Arten von Studien an Zebrafischen durchgeführt, darunter arzneimittelinduzierte Toxizitätstests in verschiedenen Organen (Goessling und Sadler, 2015; Vliegthart u. a., 2014), Neurotoxizität und Effekte auf das zentrale Nervensystem (Schill u. a., 2016; Shepherd, 2004; Uribe und Bronner, 2015), Untersuchung von Signalwegen (Molina u. a., 2010; Yu u. a., 2009) und Verhaltensstudien (Hernandez u. a., 2018; Palmér u. a., 2017; Zindler u. a., 2020b, 2020a, 2019a, 2019b). Das Genom des Zebrafisches ist vollständig sequenziert (Howe u. a., 2013) und mehrheitlich annotiert, was ihn zu einem starken Modellorganismus für genetische Studien macht (Vliegthart u. a., 2014). Ein weiteres überzeugendes Argument für den Einsatz des Zebrafisch-Embryos ist, dass der Organismus bis zum Beginn der exogenen Fütterung, die erst ab 120 hpf erfolgt, nicht durch die Versuchstierverordnung geschützt ist. Somit wird das Zebrafisch-Embryo-Testsystem als *In vivo*-Alternativversuch eingestuft, "*In vitro*" per Gesetz (Braunbeck u. a., 2005).

### 1.3.1 Der "Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test" als Teratogenitätstest

Zu den am häufigsten angewandten Testmethoden in der Teratogenitätsprüfung mit Zebrafischen gehört die OECD TG 236: der „Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test“ (OECD, 2013). Er bewertet das akute toxische Potenzial von Chemikalien für die Embryonen in den ersten 96 hpf (Embry u. a., 2010) und wurde auf eine Vielzahl von Substanzen angewendet. Das ursprüngliche FET-Test Protokoll (OECD, 2013) war darauf ausgelegt, nur vier morphologische Endpunkte zu beobachten: Koagulation, fehlende Somitenbildung, fehlender Herzschlag und Nichtablösung des Schwanzes. Diese Endpunkte wurden

ausgewählt, weil sie (1) direkt oder indirekt mit Mortalität assoziiert sind, (2) die Praktikabilität für das Screening durch gut geschultes technisches Personal verbessern und (3) die Endpunkte gut erkennbar morphologische Alterationen sind. Der FET-Test basiert auf der Prämisse, dass Embryonen, die nicht älter als 2 hpf sind, der Testchemikalie bis 96 oder 120 hpf semi-statisch ausgesetzt werden und alle 24 Stunden auf die Ausprägung vorbestimmter, letaler Endpunkte untersucht werden (Braunbeck u. a., 2005). Aus diesen Befunden werden dann die akute (LC, lethal concentration) und subletale (EC, effect concentration) Konzentration der Substanz sowie die No Observed Effect Concentration (NOEC) und die Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) ermittelt (Braunbeck u. a., 2015). Seit seiner Einführung wurden nur auf PubMed fast 2.500 FET-Teststudien aufgelistet, in denen die Auswirkungen eine Vielfalt an Substanzen auf die frühe Entwicklung des Zebrafischembryos untersucht wurden. Es hat sich gezeigt, dass der Assay eine insgesamt gute Korrelation der 50% letalen Konzentration (LC<sub>50</sub>) mit dem AFT-Test (OECD TG 203; Braunbeck and Lammer, 2006; Sobanska et al., 2018) aufweist. Dieses Protokoll wird am häufigsten in der aquatischen Toxizitätsbewertung eingesetzt (Embry u. a., 2010; Halder u. a., 2010), z.B. um den Zustand europäischer Gewässer unter der Wasserrahmenrichtlinie (EC, 2000) zu bewerten. Andere Studien zeigten jedoch, dass verschiedene Substanzen eine deutlich schwächere Toxizität im Embryo im Vergleich zum juvenilen oder adulten Zebrafisch aufweisen (Busquet u. a., 2014; Klüver u. a., 2015, 2014; Knöbel u. a., 2012). Eine Studie, die 161 Pestizide untersuchte, zeigte zudem, dass der FET-Test neurotoxische Substanzen scheinbar unterschätzte (Glaberman u. a., 2017). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der FET-Test, ähnlich wie die zuvor diskutierten Assays, zwar eine gut entwickelte und insgesamt zuverlässige alternative Testmethode ist, die Ergebnisse jedoch unter Berücksichtigung seiner Mängel interpretiert werden müssen, um falsch positiv Ergebnisse für bestimmte Gruppen von Substanzen, wie z. B. neurotoxische Stoffe, zu vermeiden.

### 1.3.2 Entwicklungsbedingte Neurotoxizität im Zebrafischembryo

Das Gehirn des Zebrafischembryos ist dem anderer Wirbeltiere strukturell sehr ähnlich (Lowery und Sive, 2004; Tropepe und Sive, 2003) und ähnelt in vielen Aspekten der Neurochemie des menschlichen Gehirns mit Neurotransmittern wie Gamma-Aminobuttersäure (GABA), Dopamin, Serotonin, Acetylcholin (ACh) und Glutamat (Kalueff u. a., 2014; Panula u. a., 2010). Darüber hinaus erlaubt der Zebrafischembryo aufgrund seiner Transparenz die Untersuchung spezifischer Neuronen mittels *in-situ*-Hybridisierung oder Immunhistochemie sowie *In vivo*-Farbstoffinjektionen (McGrath und Li, 2008). Solche Studien haben gezeigt, dass z.B. die Belastung mit 4-Methylbenzyliden-Campher die Somitenausbildung und die Ausbreitung von primären und sekundären Motoneuronen-Axonen in Zebrafischembryonen reduziert (Li u. a., 2016). Eine weitere Testmethode, die an Popularität gewonnen hat, ist der Acetylcholinesterase (AChE)-Test (Kais u. a., 2017, 2015). AChE ist für die Umwandlung des ACh in Acetat und Cholin an der Synapse verantwortlich und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission. Darüber hinaus wird es mit der Entwicklung des neuronalen Systems, der Muskeln

und des Axonwachstums in Verbindung gebracht (Schock u. a., 2012), was seine Bedeutung im Organismus und seine Anwendbarkeit für DNT-Tests unterstreicht. Neben diesen biomolekularen Ansätzen bietet der Zebrafisch-Embryo auch die Möglichkeit, neuronale Aktivität *in-situ* zu beobachten und zu verfolgen (Chen u. a., 2018). Ökotoxikologische Testmethoden für (D)NT nutzen das sich entwickelnde Nervensystem, um das Potenzial einer Chemikalie zur Beeinträchtigung seiner Funktion zu bewerten, was zu messbaren Reaktionen führt (Selderslaghs u. a., 2013). Eine wachsende Anzahl von Studien untersucht diese neurotoxischen Effekte, indem sie sich auf quantifizierbare Verhaltensparameter konzentrieren, wie z. B. die spontane Schwanzbewegung während der Embryogenese oder vordefinierte Schwimmuster (Weichert u. a., 2017). Diese Verhaltensassays haben an Popularität gewonnen, da solche Endpunkte häufig empfindlicher sind als Beobachtungen, die auf z. B. Mortalität und Wachstum basieren (Melvin und Wilson, 2013), und sind außerdem ökologisch relevant (Faimali u. a., 2017).

Die früheste Bewegung, die im Zebrafisch beobachtet werden kann, ist das spontane Einrollen (oder auch Coiling), das um 17 hpf mit einer Frequenz von etwa 0,57 Hz beginnt und durch zufällige Neuronensignale verursacht wird (Brustein u. a., 2003). Die Coilingfrequenz wird um 17 hpf zum ersten Mal messbar, erreicht um 19 hpf mit 0,96 Hz ihren Höhepunkt und sinkt bis 27 h (Saint-Amant & Drapeau, 1998). Studien konnten bisher zeigen, dass diese frühe Bewegung noch keine Kleinhirn gesteuerte Bewegung ist (Brustein u. a., 2003) und ausschließlich von einem einfachen spinalen neuronalen Schaltkreis abhängt. Diese frühe, zufällige Bewegung wird durch die berührungsevozierte Bewegung ersetzt, die bereits im 21 hpf beobachtet werden kann und mit den Trigemini- und Rohon-Bart-Neuronen in Verbindung gebracht wurde (Brustein u. a., 2003). Das Verhalten wird durch glutamaterge und glyzinerge Rezeptoren innerhalb des Bewegungsapparates gesteuert, der anfällig für chemische Störungen ist (Ramlan u. a., 2017; Saint-Amant und Drapeau, 1998). Während man annimmt, dass dieses Verhalten physiologische Vorteile für die weitere Entwicklung des Körperplans bietet (Saint-Amant und Drapeau, 1998), wurde auch vermutet, dass diese Impulse als Gerüst für komplexeres lokomotorisches Verhalten dienen (Brustein u. a., 2003).

Auf das Coiling folgt das aktive Schwimmen, sobald der Embryo geschlüpft ist und sich die Schwimmblase voll entwickelt hat (Basnet u. a., 2019). Dieses Verhalten kann auch genutzt werden, um die Neuroentwicklung des Embryos einzuschätzen (Hernandez u. a., 2018). Es wird angenommen, dass die komplexen Strukturen, die am Schwimmverhalten beteiligt sind, bei allen Wirbeltieren konserviert sind (Grillner u. a., 2005) und wahrscheinlich auf den gleichen Neurotransmittern basieren (Horzmann und Freeman, 2016). Frühe Schwimmbewegungen bilden die Grundlage für das spätere „Beat-and-Glide“-Schwimmmuster (Drapeau u. a., 2002; Saint-Amant und Drapeau, 1998). Inzwischen ist bekannt, dass diese Bewegungsmuster von der korrekten Entwicklung und Funktion des Gehirns, des Nervensystems und der Augen abhängt (Ali u. a., 2012; Bilotta, 2000), und in neueren Testprotokollen werden verschiedene Aspekte dieses Verhaltens untersucht. Der Schwimmverhaltens-Assay (Zindler u. a., 2020a) analysiert die Bewegungsfrequenz

und -distanz zwischen 92 und 120 hpf, basierend auf der Erkenntnis, dass der Zebraärb-  
lings-Embryo unter normalen Entwicklungsbedingungen eine erhöhte Schwimmaktivität  
im Dunkeln zeigt (Burgess und Granato, 2007; Colón-Cruz u. a., 2018). Variationen des  
Schwimmtests wurden verwendet, um die Wirkung externer Stimuli zu bewerten, was  
einen Einblick in neuroaktive Wirkungen einer Substanz ermöglicht, wie z. B. die erhöhte  
anxiolytische Reaktion von Zebraärb-lingen-Embryonen auf Nikotinexposition  
(Wronikowska u. a., 2020).

#### 1.4 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

In der vorliegenden Arbeit werden die Begriffe „DART“ und „DNT“ dazu verwendet, die  
verwendeten Substanzen in zwei Gruppen zu unterteilen: (1) Substanzen mit diversen  
Wirkungsmechanismen, welche bereits dafür bekannt sind, einen (oder mehrere) Ent-  
wicklungsprozesse zu stören (DART), und (2) Substanzen, welche in anderen Testsystemen  
die neuronale Entwicklung beeinträchtigen (DNT).

Ziel dieser Dissertation ist es, die Anwendbarkeit des Zebraärb-lingen-Embryos für die  
Bestimmung von DART- und (D)NT-Endpunkten zu bewerten. Um diese Problematik zu  
analysieren, wurde der FET-Test mit einer Reihe an DART Substanzen aus verschiedenen  
chemischen Klassen getestet. Hier wurden nicht nur die vier Endpunkte der OECD TG  
236, sondern auch alle weiteren makroskopisch wahrnehmbaren Entwicklungsverände-  
rungen mit dem Ziel gemessen, die Sensibilität des Testes zu verbessern und einen bes-  
seren Einblick in die verschiedenen toxikologischen Mechanismen zu gewinnen, welche  
diesen Endpunkten unterliegen. Als Probe dieser Hypothese wurden dann Substanzen,  
welche Tremor als einen Effekt hervorriefen, zusätzlich im Coiling-Assay getestet, um zu  
prüfen, ob diese Observation im FET-Test auf die potenzielle Neurotoxizität dieser Sub-  
stanzen zurückgeführt werden kann. Als weiter Sensitivitäts-test wurden Nikotin und ei-  
nige Neonicotinoide ebenfalls im FET-Test getestet, bevor der Coiling- und der  
Schwimmverhaltens-Assay verwendet wurden, um eventuelle Entwicklungsschäden in  
sub-letalen Konzentrationen zu testen. Diese Arbeit wurde als Teil des EU-ToxRisk Pro-  
jektes mit dem übergreifenden Ziel durchgeführt, eine mögliche Testbatterie für das Tes-  
ten von DART und DNT Effekten zu entwickeln.

## Kapitel 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

#### 2.1.1 Entwicklungsschädigende Substanzen diverser chemischer Klassen

Alle getesteten Substanzen wurden vom Joint Research Centre (JRC) mit einer Reinheit von >98% vertrieben, und der Versand und die Lagerung erfolgten gemäß den Anweisungen der Hersteller. Acrylamid, 3,4-Dichloranilin (3,4-DCA), 1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumiodid (MPP<sup>+</sup>), Hexachlorphen, Paracetamol, polychloriertes Biphenyl 180 (PCB 180), Tolbutamid und Triphenylphosphat wurden von Sigma Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen; Carbaryl, Clofibrat, Colchicin, Paraquat, Rifampicin, Sulfoxazol und Taxol wurden von Carbosynth (Carbosynth, Compton, UK) bezogen; Ibuprofen, Rotenon und Tebuconazol wurden von TCI (Eschborn, Deutschland) bezogen; und Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde von Honeywell International (Offenbach, Deutschland) gekauft. Ibuprofen, Sulfoxazol und Tolbutamid wurden als Negativkontrollen für die DART-Substanzen durch das EU-ToxRisk-Konsortium ausgewählt. Detaillierte chemische und umweltbezogene Informationen zu den Testsubstanzen finden Sie in Annex 1, Tabelle 1 und Tabelle 2. Stammlösungen wurden in standardisiertem Wasser (OECD, 1981a) oder DMSO hergestellt und für jedes Replikat aliquotiert, und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Substanzen mit reduzierter Löslichkeit wurden mit einer maximalen DMSO-Endkonzentration von 0,1% hergestellt, mit Ausnahme von Carbaryl und Ibuprofen, die eine DMSO-Endkonzentration von 0,5% benötigten. Während der Versuchsdurchläufe wurden die Aliquote der Stammlösungen aufgetaut und bei 4 °C gelagert, um die Anzahl der Gefrier-Auftau-Zyklen zu reduzieren. Die Lösungen von Paracetamol und Paraquat wurden im Dunkeln gelagert. Da Colchicin sehr reaktiv ist, wurde die Stammlösung täglich frisch hergestellt.

#### 2.1.2 Neuronalentwicklung-schädigende Substanzen (Neonicotinoide)

Alle getesteten Substanzen wurden vom JRC vertrieben und der Versand und die Lagerung erfolgten gemäß den Anweisungen der Hersteller. Acetamiprid, Dinotefuran, Clothianidin, Imidacloprid, Nikotin, Thiamethoxam und Thiacloprid wurden von Sigma Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen und DMSO wurde von Honeywell International (Offenbach, Deutschland) gekauft. Detaillierte chemische und umweltrelevante Informationen zu den Testsubstanzen sind in Annex 1, Tabelle 1 und Tabelle 2 zu finden. Die Stammlösungen wurden einmalig in DMSO hergestellt und für jedes Replikat aliquotiert, um sie bis zur Verwendung bei -20 °C zu lagern. Alle Stammlösungen wurden mit einer DMSO-Endkonzentration von 0,1% hergestellt. Während der experimentellen Läufe wurden die Aliquote der Stammlösungen aufgetaut und bei 4 °C gelagert, um die Gefrier-Auftau-Zyklen zu reduzieren.

## 2.2 Experimentelle Methoden

### 2.2.1 Tierhaltung

Adulte Wildtyp-Zebrabärblinge ("Westaquarium") wurden aus der Zuchtanlage der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie und Toxikologie des „Centre for Organismal Studies“ (Universität Heidelberg; Lizenz-Nr.: 35-9185.64/BH) bezogen. Fischhaltung, Zuchtbedingungen und Fortpflanzung orientierten sich an international anerkannten Standards (siehe Lammer u. a. 2009). Adulte Zuchttiere wurden in Gruppen von bis zu 10 Individuen gehalten (Verhältnis 2/1 Männchen/Weibchen). Die adulten Fische wurden zweimal täglich mit Artemien (*Artemia Nauplii*) und kommerziellem Trockenfutter (TetraMin Flakes, Tetra, Melle, Deutschland) gefüttert. Der Wasserdurchfluss, die Temperatur, die Belüftung und der allgemeine Gesundheitszustand der Fische wurden täglich und die Wasserparameter wöchentlich kontrolliert. Darüber hinaus wurde die Herkunft der Fische für alle Zucht- und Versuchsgruppen katalogisiert, um die genetische Variation zu gewährleisten, und es wurden Zuchtpläne zur Qualitätskontrolle geführt. Am Tag vor der Eisammlung wurden die adulten Fische ausgewählter Zuchtgruppen in die Ablacheinheiten überführt, die aus einem 40-Liter-Becken mit einem abgewinkelten Sammeleinlass unterhalb einer kleineren Halteeinheit mit einem Gitterboden bestanden, um die abgelegten Eier von den adulten Fischen zu trennen. Die Belüftung des Wassers wurde sichergestellt, und es wurden künstliche Pflanzen verwendet, um das Ablachen zu induzieren, sowie eine Heizeinheit, um eine konstante Temperatur um  $26 \pm 1$  °C zu gewährleisten. In Übereinstimmung mit dem natürlichen Verhalten wurde das Ablachen mit dem „Sonnenaufgang“ (Licht-einschalten um 7.30 Uhr) ausgelöst. Adulte Fische wurden aus den Laicheinheiten entfernt und die Eier bis ~1 hpf eingesammelt. Diese wurden dann sorgfältig gewaschen, um Schmutz und Fäkalien zu entfernen, bevor sie zur Qualitäts- und Quantitätsbeurteilung in große Glasschalen mit Wasser gelegt wurden. Wenn mehr als eine Zuchtgruppe eingerichtet wurde, wurden die Eier separat bewertet und die Aufzeichnungen aufbewahrt.

### 2.2.2 Der FET-Test (OECD TG 236)

Abbildung 1 beschreibt das FET-Test Protokoll. In Anlehnung an die OECD TG 236 (OECD, 2013) wurden befruchtete Eier ( $\pm 1$  hpf) in vor-inkubierte Glasschalen mit den jeweiligen Testlösungen (Negativ-, Lösungsmittel-, und Positivkontrolle oder die entsprechenden Konzentration der Testsubstanz) überführt, und dann in einzeln in 24-Well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) mit 2 ml Testlösung pro Well platziert. Anschließend wurden die Well-Platten mit selbstklebender Folie (Seal-Plate® von EXCEL Scientific, Dunn, Asbach, Deutschland) versiegelt, um Kontaminationen und Verdunstung zu vermeiden, und in einem Inkubator bei  $26 \pm 1$  °C unter einem 14/10-Stunden Hell/dunkel-Lichtzyklus gestellt. Alle Well-Platten wurden mindestens 24 Stunden mit den Testlösungen vor-inkubiert, um die Sättigung der Wells sicherzustellen. Das Testmedium wurde täglich erneuert (semi-statische Belastung) und alle Entwicklungsveränderungen wurden nach 24, 48, 72, und 96 hpf (und 120/144 hpf in einigen Fällen) dokumentiert, bevor das Medium erneuert wurde. Die Validierungskriterien für den FET-Test wurden gemäß der OECD TG 236

(OECD, 2013) angewandt: (1) eine minimale Mortalitätsrate von 30% in der Positivkontrolle (4 mg/l 3,4-DCA); und (2) eine maximale Effektrate von 1% in der Negativkontrolle (standardisiertes Wasser) bei 96 hpf. Wenn diese Parameter nicht erfüllt wurden, wurde der FET-Test als ungültig befunden und musste wiederholt werden. Die Embryonen wurden unter einem Olympus CKX41 Inversmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert, die Bilder wurden mit einer Olympus C5040 AUD Kamera aufgenommen. Alle FET-Tests wurden mit mindestens 3 Replikaten durchgeführt, es sei denn, es wurden zuvor kleine Bereichsfindungsstudien durchgeführt. In diesem Fall wurden 2 vollständige FET-Tests akzeptiert, wenn diese nicht um mehr als 10% von den Ergebnissen der vorherigen Studie abwichen. Zusätzlich zu den vier von der OECD TG 236 festgelegten Endpunkten wurden alle zusätzlichen Beobachtungen als weitere Endpunkte aufgezeichnet und mit Bildern dokumentiert. Für Substanzen, von denen bekannt ist oder festgestellt wurde, dass sie eine verzögerte Toxizität aufweisen, z. B. wenn das Chorion die Belastung behindert oder eine Organentwicklung notwendig ist, wurde die in der OECD TG 236 (OECD, 2013) angegebene Standardexpositionsdauer von 96 h auf bis zu 144 h verlängert.

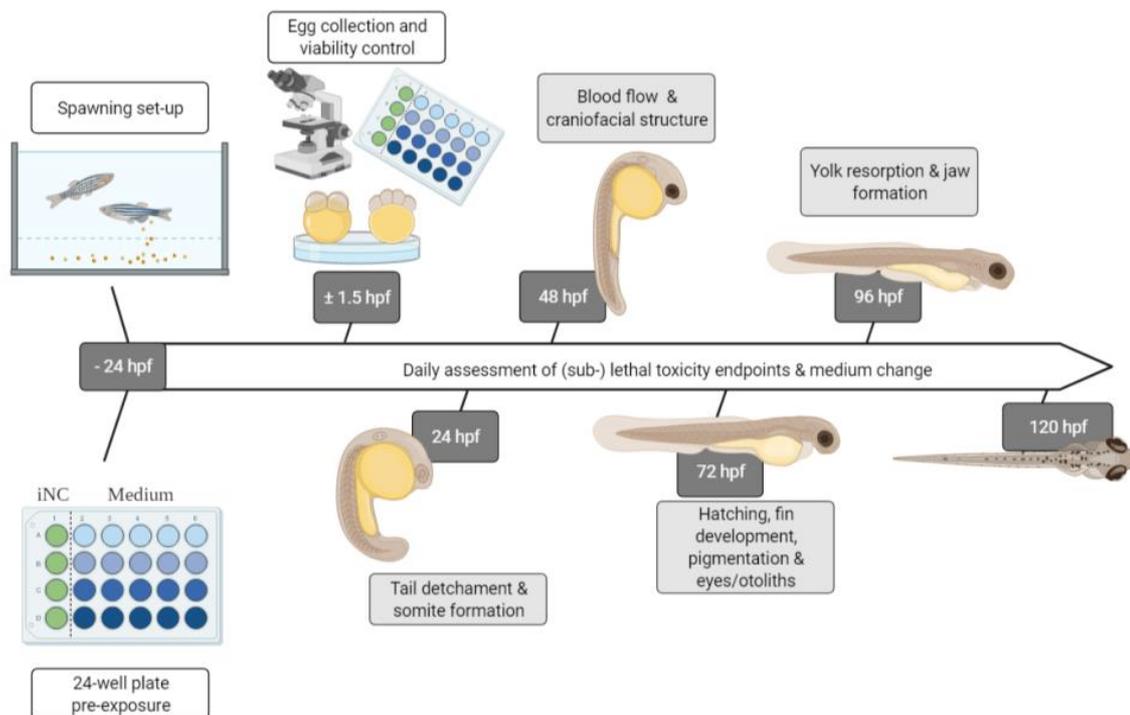


Abbildung 1. Der Aufbau und Ablauf des FET-Tests, sowie Beispiele für Endpunkte und das Entwicklungsstadium zu jedem Auswertungs-Zeitpunkt des Assays

### 2.2.3 Der Coiling-Assay

Zunächst wurden die  $\pm 1$  hpf alten Eier gemäß OECD TG 236 behandelt. Die ausgewählten Eier wurden in 50 ml Glasschalen bei  $26 \pm 1$  °C mit den entsprechenden Konzentrationen für die weitere Entwicklung platziert (Abbildung 2). Ab 7 hpf wurden jeweils 5 Embryonen pro Well in vorbelastete 24-Well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) überführt und mit einem ebenfalls vorbelasteten Polytetrafluorethylen-Ring von 5,3 mm Durchmesser

zentriert (ESSKA, Hamburg, Deutschland). Die 24-Well-Platte enthielt vier Testkonzentrationen und eine Negativkontrolle, welchen zufällig auf der Well-Platte verteilt wurden, um auszuschließen, dass Faktoren wie die Position innerhalb des Inkubators Entwicklungsunterschiede induzieren. In den Fällen in den DMSO als Lösungsmittel erforderlich war, wurde die Negativkontrolle durch die Lösungsmittelkontrolle ersetzt. Das Medium in den Platten wurde alle 24 Stunden erneuert. Die Platte wurde auf einer Acrylglas Abdeckung mit zwölf Infrarotlampen (880 nm Wellenlänge, 40° Lichtwinkel, 5 mm Durchmesser, Knightbright, Taiwan) in einem Inkubator bei  $26 \pm 1$  °C und einem Hell/Dunkel-Zyklus von 14/10 h platziert. 8-minütige Aufnahmen (mpeg-4, 25 Bilder/s) wurden stündlich mit der Ethovision Software (Noldus, Wageningen, Niederlande) zwischen 21 und 47 hpf gefilmt (Kamera: Basler acA1920-155µm, Ahrensburg, Deutschland; Objektiv: M7528-MP F2.8 f75mm, computar, Basler, Ahrensburg, Deutschland; Filter: heliopan, RG850, Gräfelfing, Deutschland) und mit dem Noldus Danioscope Softwarepaket analysiert. Um unnötige Bewegungen zu vermeiden, wurde der Inkubator jede Stunde für 15 Minuten ausgeschaltet, 3 Minuten vor Beginn der Aufzeichnung (Zindler u. a., 2019a).

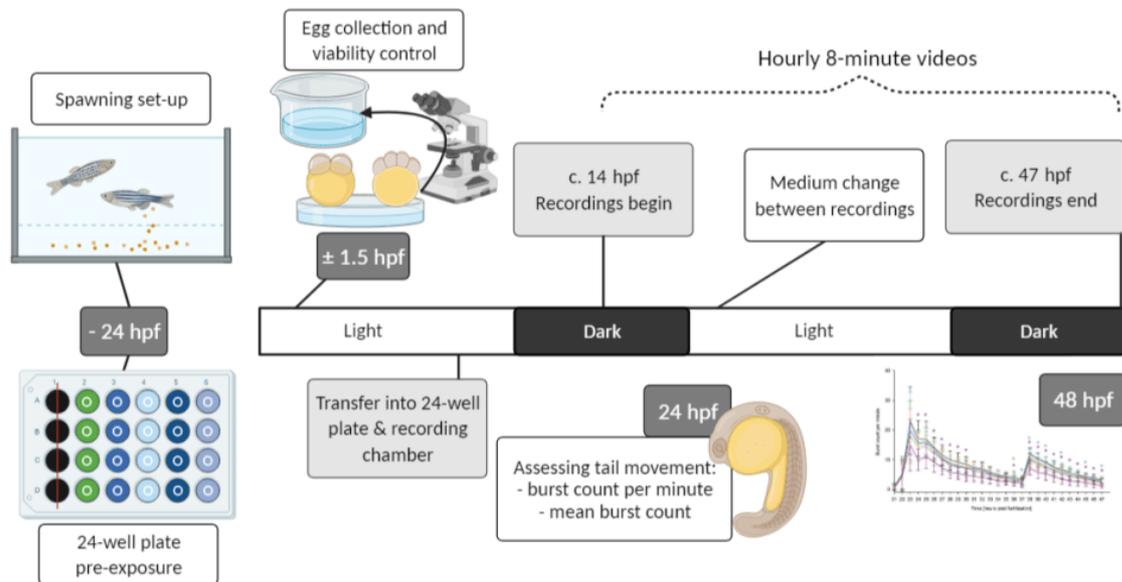


Abbildung 2. Der Aufbau und Ablauf des Coiling-Assays sowie der Lichtzyklus, analysierte Endpunkte, und Auswertungsbeispiele

#### 2.2.4 Der modifizierte Coiling-Assay mit räumlich getrennten Embryonen

Die befruchteten Embryonen wurden gemäß der OECD TG 236, und der bereits beschriebenen Methoden behandelt. In dieser Variation wurden die Embryonen räumlich in dem Well-Platte voneinander getrennt, indem pro Well eine Teflon Platte (5,3 mm Durchmesser, Universität Heidelberg, Feinmechanik) mit 5 Aussparungen platziert wurden (Abbildung 3). Am Protokoll und der Auswertung wurde sonst nichts verändert.

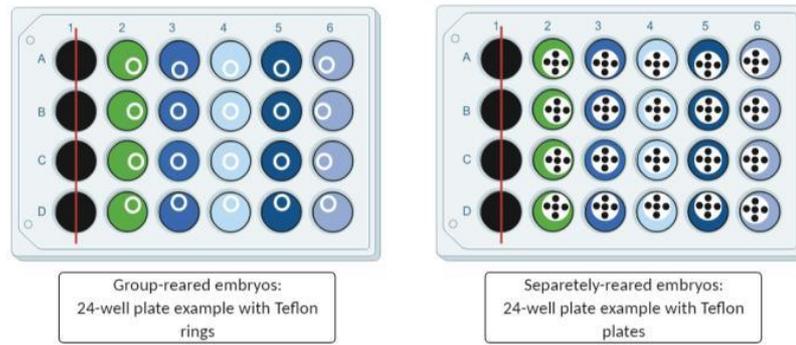


Abbildung 3. Belegung der 24-Well Platten für die zusammen und separat aufgezogenen Embryonen im Coiling-Assay. Die erste Spalte an Wells (schwarz) konnte wegen der Kameraeinstellung nicht verwendet werden, alle weiteren Farben stellen verschiedene Lösungen dar

### 2.2.5 Der Schwimmverhaltens-Assay

Die befruchteten Eier wurden gemäß OECD TG 236 behandelt und in 50 ml Glasschalen bei  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  mit den entsprechenden Konzentrationen für die weitere Entwicklung platziert (Abbildung 4). Nach täglichem Mediumwechsel wurden die Embryonen nach 72 hpf in vor-inkubierte 96-Well-Platten überführt mit 19 Embryonen pro Konzentration. Die Well-Platte wurde dann in die DanioVision Observation Chamber (Noldus, Wageningen, Niederlande) mit kontinuierlichem Wasserfluss platziert, um  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  sowie den 14/10 h Hell/Dunkel-Zyklus zu gewährleisten. Von 83 - 120 hpf wurden stündlich 15-minütige Videos mit der EthoVision Software aufgenommen. Aufgrund der semi-statischen Natur der Belastung musste das Medium auch während der Aufnahmen täglich erneuert werden, wobei darauf geachtet wurde, dass die Platte spätestens 20 Minuten vor der nächsten Aufnahme in der Observation Chamber platziert wurde, damit sich die Embryonen wieder akklimatisieren konnten. Die Videos wurden mit der DanioScope Software analysiert.

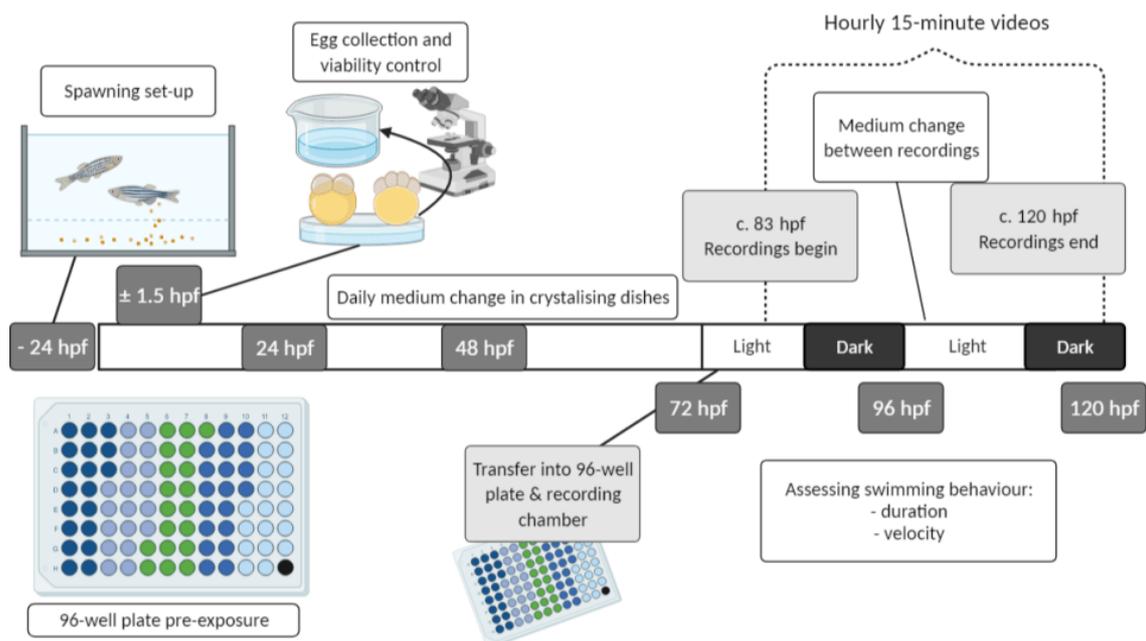


Abbildung 4. Aufbau und Ablauf des Schwimmverhaltens-Assays sowie der Lichtzyklus und analysierte Endpunkte.

## 2.2.6 Analyse der Neonicotinoid-Wasserproben (durch CyproTex)

*Massenspektrometrie (MS) Probenvorbereitung:* Pro Replikat und Konzentration (einschließlich der Negativ- und Lösungsmittelkontrollen) wurden am Ende des 120 hpf-Expositionsschemas 2 ml des Expositionsmediums in gefriersicheren Eppendorf-Röhrchen gesammelt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zusätzlich wurden auch 2 ml frisch hergestellte Lösungen gefroren. Die Röhrchen wurden verpackt und bei -80 °C gelagert, bis sie zur Analyse geschickt wurden. Für den Versand wurde Trockeneis verwendet, um eine kontinuierliche Kühlkette zu gewährleisten.

*Quantifizierung der Substanzen durch Flüssigchromatographie (LC)-MS/MS:* In einem Chromatogramm wird unter bestimmten LC-Systembedingungen die Substanz (der Analyt) abgetrennt und zu einer bestimmten Retentionszeit von der Säule eluiert. Wenn unter den gleichen Bedingungen eine Probe mit diesem Analyten in das LC-System injiziert wird, würde ein Peak, der dem Analyten entspricht, mit der gleichen Retentionszeit vorhanden sein. Zur Bestimmung der in der Probe vorhandenen Substanzmenge wird das Chromatogramm ausgewertet und die Fläche unter dem Peak quantifiziert, die direkt proportional zur Gesamtmenge des Analyten in der Probe ist. Zur absoluten Quantifizierung ist eine Standardkurve des Analyten erforderlich. Proben, welche die Testsubstanzen enthielten, wurden mit einem System analysiert, das aus einem Acquity TM Binary Solvent Manager (BSM), einem Acquity TM 4-Positionen-Heizsäulenmanager, einem 2777 Ultra High Pressure Autosampler und einem Xevo TQ MS Triple Quadrupole Massenspektrometer (Waters Ltd, Herts, UK) bestand. Die Analyse wurde mit einer Acquity TM HSS T3-Säule (1,8 µm) 2,1 x 30 mm (Waters Ltd, Herts, UK) durchgeführt, die mit einer SecurityGuard TM ULTRA Fully Porous Polar C18-Kartusche (Phenomenex, Cheshire, UK) ausgestattet war. Die Säule wurde bei 40 °C gehalten und das Injektionsvolumen betrug 4 µl. Details sind in Annex I, Tabelle 1 aufgeführt.

## 2.3 Datenanalyse

### 2.3.1 Auswertung des FET-Tests

LC- und EC-Konzentrationen wurden bei Effektstärken von 10 und 50% auf der Grundlage einer Probit-Analyse mittels linearer Maximum-Likelihood-Regression mit ToxRat® (Version 2.10.03; ToxRatTM Solutions, Alsdorf, Deutschland) berechnet. Hierzu wurden die beobachteten Effekte verwendet, um die akute und subletale Toxizität der getesteten Substanzen für 96, 120 und 144 hpf zu berechnen. Die LC-Werte wurden unter Berücksichtigung der zu einem bestimmten Zeitpunkt beobachteten letalen Endpunkte berechnet, während die EC-Werte auf der Grundlage von sowohl letalen als auch subletalen Effekten berechnet wurden (Braunbeck u. a., 2015). Zur besseren Veranschaulichung bestimmter Morphologien und Pathologien wurden die interessierenden Bereiche in den Mikrofotografien, die während der Routinebeobachtung aufgenommen wurden, durch die Anpassung der Lichtintensität und -sättigung mit Photoshop CS5 (Adobe, München, Deutschland) optimiert. Die relativen Häufigkeiten wurden wie folgt berechnet: Der Prozentsatz der koagu-

lierten Embryonen wurde auf Basis aller Organismen des jeweiligen Konzentrationsbereichs berechnet, während der Prozentsatz aller anderen letalen Endpunkte auf Basis der Anzahl der nicht koagulierten Individuen berechnet wurde. Die relativen Prozentsätze für subletale Effekte wurden auf der Grundlage der überlebenden Embryonen berechnet. Die Daten wurden auch auf zeitabhängige Änderungen der LC-Werte ab 72 hpf mittels Kruskal-Wallis und anschließendem Dunn's *post hoc* Test analysiert, der in SigmaPlot v.13.0.0.83 (Systat Software, San Jose, CA) enthalten ist.

### 2.3.2 Auswertung des Coiling-Assays

Die Rohdaten der Videoanalyse wurden auf die „mean-burst-count-per-minute“ und die „mean-burst-duration“ ausgewertet. Um falsch positiv/negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Programmparameter an das beobachtete Verhalten der Embryonen angepasst (Annex II, Tabelle 2). Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism (Version 6 für Windows, GraphPad Software) durchgeführt. Die parametrische Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) auf Rängen (Kruskal Wallis Test) wurde verwendet, um die Unterschiede in den Mittelwerten der Coilingfrequenz der getesteten Gruppen zu analysieren, gefolgt von einem Dunn's *post hoc* Test gegen die Kontrollen, der für jedes Replikat separat durchgeführt wurde. Jede Chemikalie wurde in unabhängigen Replikaten (n=3) getestet und mindestens zwei von drei Replikaten mussten statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ) pro Zeitpunkt sein, um als expositionsbezogen zu gelten. Zur Darstellung wurden die Daten auch auf die entsprechenden Kontrollgruppen normalisiert. Des Weiteren wurde die stufenweise Veränderung (SC) beider Verhaltensparameter zwischen 37 und 38 hpf bewertet, um die Wirkung des Lichtwechsels auf die Zebrafisch-Embryonen zu untersuchen. Hierzu wurde der Verhaltenswert von 38 hpf von dem von 37 hpf subtrahiert. Die Werte der Standardabweichung wurden auch so berechnet. Dann wurden die Werte berechnet, die von der Kontrollgruppe um 10% (SC<sub>10</sub>) und 50% (SC<sub>50</sub>) abweichen, sowohl negativ als auch positiv. Die Graphen wurden dann mit Inkscape (Version 1.0.1) angepasst, um die Balken des Hell-Dunkel-Zyklus zu integrieren. Die Kontrollgruppen der zwei Aufbauten des Coiling Assay wurden mit einem zweiseitigen Mann Whitney U-Test statistisch ausgewertet.

### 2.3.3 Auswertung des Schwimmverhaltens-Assays

Die Bewegungsdistanz und -häufigkeit wurden für jede Substanz bewertet und die Videoparameter sind in Annex II, Tabelle 2 zu finden. Jedes Replikat wurde einzeln ausgewertet und mit der entsprechenden Kontrolle verglichen. Die Open-Source-Statistiksoftware RStudio (Version 1.3.959; der Software R, Version 4.0.2 für Windows; R Developmental Core Team, 2020), wurde für die statistische Berechnung und Datendarstellung verwendet. Zusätzlich wurde Inkscape (Version 0.92.4) für die Nachbearbeitung der Vektorgrafiken verwendet. Das Outlier-Screening wurde mit der R-Funktion 'identify\_outliers' (rstatix-Paket, Version 0.5.0) für jedes biologische Replikat durchgeführt. Der „distance moved“ Parameter wurde wie folgt gehandhabt: (1) Die Rohdaten wurden untersucht und Schätzungen mit Werten >1,0% (die Cut-off-Schwelle) in „missed samples“ entfernt und die verbleibenden Daten in 3-5 Stunden-Bins gepoolt. Eine Outlier-Analyse wurde implementiert, gefolgt

von einer nicht-parametrischen Analyse und dem Dunn's *post hoc* Test. (2) Die über die aufgezeichneten 25 h total distance-moved wurde durch Aufsummieren der pro Individuum zurückgelegten Strecke über alle Zeitpunkte geschätzt. Diese Daten wurden mit einer parametrischen one-way-ANOVA und einem Vergleich der Mittelwerte der Behandlungsgruppen gegen eine Kontrollgruppe (Dunnett-Test, Packung 'multcomp', Version 1.4.13) bewertet. Die Effektgröße wurde in Form von Eta-Quadrat ( $\eta^2$ ) geschätzt und kann wie folgt interpretiert werden 0-0,010: kein Effekt, 0,010-0,060: kleiner Effekt, 0,060-0,140: mittlerer Effekt, und 0,140-0,200: großer Effekt. Zur Bestimmung des „swimming frequency“ Parameters wurden die Rohdaten in Zeitschritten von 0,4 Sekunden ausgewertet und als Bewegung gewertet, wenn nach einer Zeitspanne von mindestens 5 Sekunden ohne Bewegung eine Aktivität registriert wurde, die eine Unterscheidung zwischen tatsächlicher Bewegung und dem Hintergrundsignal erlaubt.

#### 2.3.4 Auswertung der chemischen Analysen der Neonicotinoid-Wasserproben (durch CyproTex)

Im Rahmen das EU-ToxRisk Projektes wurden Wasserproben durch den Projektpartner CyproTex (Cheshire, United Kingdom) analysiert. Für jedes Neonicotinoid wurden separate Kalibrierkurven erstellt, indem Wasserproben mit bekannten Konzentrationen dieser Substanzen aufgestockt wurden. Für alle Substanzen zeigte eine Kalibrierungskurve, dass bei niedrigen Aufstockungskonzentrationen eine Nachweisgrenze auftrat. Die Peakflächen wurden angepasst, indem die Werte durch einen maschineninternen Standardwert, der für jeden Datenpunkt separat bestimmt wurde, und durch das geschätzte Volumen aller Organismen dividiert wurden. Dies ergab einen Wert, der proportional zur Konzentration innerhalb der Individuen war. Die Werte der Nachweisgrenze (LOD, aus dem Englischen: limit of detection) sind in Annex I, Tabelle 1 zusammengefasst.

## Kapitel 3. Die Ergebnisse der FET-Tests mit Substanzen diverser chemischer Klassen <sup>1</sup>

3.1 Die Beobachtung spezifischer und unspezifischer Endpunkte des FET-Tests  
Obwohl eine beachtliche Datenbank über morphologische Veränderungen im Zebrabärblings-Embryo nach Belastung mit Schadstoffen aufgebaut wurde (Belanger u. a., 2013; Scholz u. a., 2014), gibt es noch immer einige Widersprüche in Bezug auf die bewerteten Endpunkte. Viele Autoren präsentieren eine schlecht definierte Liste von Beobachtungen und vernachlässigen einige Veränderungen zur Gänze. Diese Unstimmigkeit der verwendeten Nomenklatur stellt eine weitere Herausforderung für die Vergleichbarkeit der in der Literatur präsentierten Ergebnisse dar. So wird z.B. der Begriff Lordose häufig für alle Arten von Rückenverkrümmung und -deformation verwendet, obwohl eine Unterteilung in Lordose (Überstreckung des Rückens), Kyphose (Rundrücken) und Skoliose (seitliche Verkrümmung) erfolgen sollte. Während einige Publikationen Lordose korrekt als Überstreckung des Rückens bezeichnen (Labonty u. a., 2017; Matson u. a., 2008; Seok u. a., 2006; Xu u. a., 2011), wird in anderen Publikationen mit diesem Begriff beschrieben, was Skoliose genannt werden müsste (Issa u. a., 2019). In einer weiteren Publikation wurde zwar die Lordose korrekt bestimmt, aber Skoliose als "Wirbelsäulenflexion (Schwanzdefekt)" aufgeführt, während das, was als Kyphose aufgeführt wurde, tatsächlich ein Bruch der Wirbelsäule zu sein scheint (Şişman und Geyikoğlu, 2008).

Dieses Kapitel dient der Auswertung aller im FET-Test beobachteten Endpunkte, welche von insgesamt 48 Substanzen hervorgerufen wurde. Durch die Erweiterung der Auswertung von den vier OECD TG 236 Endpunkten, wurde die Bestimmung von spezifischen und unspezifischen Entwicklungsveränderungen ermöglicht. So wurden Effekte als unspezifisch deklariert, wenn diese von einer Vielzahl der Substanzen hervorgerufen wurden, während spezifische Endpunkte nur in wenigen Fällen zu beobachten waren. Zu diesem Zweck wurde der in Kapitel 2 beschriebene FET-Test mit den DART Substanzen angewandt. Tabelle 1 zeigt verwendeten Konzentrationen der DART Substanzen, während Tabelle 2 die experimentellen Informationen für die übrigen Substanzen enthält. Detaillierte Informationen sind in Annex II Tabelle 1 and Tabelle 2 zu finden. Dr. Ruben Strecker, Christoph Gade und Dr. Katharina Brotzmann testeten: Carbamazepin, Kupfer(II)-Sulfat, Dibutylmaleat, 3,4-DCA, 2, 2-Dimethylvaleriansäure, Dinitro-o-cresol (DNOC), 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP), Ethanol, 2-Ethylbuttersäure, 2-Ethylhexansäure, Hexansäure, Luviquat, Malathion, Merquat, 2-Methylhexansäure, 6-Methyl-5-heptene-2-on, 2-Methylpentansäure, Methylquecksilber(II)-chlorid, 1-Octanol, 4-Pentensäure, Prochloraz, 2-Propylheptensäure, Natriumchlorid, Natriumtetradecylsulfat (STS), Triclosan, Triethylenglykol,

---

<sup>1</sup> Teile der Befunde und die Darstellungen, die in diesem Kapitel diskutiert werden wurden veröffentlicht in: von Hellfeld et al., (2020). Adverse effects in the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test: A catalogue of unspecific morphological changes *versus* more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Environmental Sciences Europe. DOI: 10.1186/s12302-020-00398-3

2,3,6-Trimethylphenol, Valproinsäure und Zinkpyrithion (Sigma Aldrich, Deisenhofen); Methylquecksilber(II)-chlorid (Carbosynth, Compton, UK); und 4-En-Valproinsäure (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA). Die aus den Untersuchungen hervorgehenden Ergebnisse wurden mit Erlaubnis der betreffenden Personen in dieser Dissertation verwendet, um die Spezifität der Endpunkte dazustellen.

Tabelle 1. Testkonzentrationen der DART-Substanzen [mg/l] im FET-Test, sowie das verwendete Medium und Lagertemperatur [°C] der Stammlösungen

<b>Substanzen</b>	<b>Testkonzentrationen</b>	<b>Medium</b>	<b>Lagerung</b>
Acrylamid	43.75, 87.5, 175, 350	SW	RT
Carbaryl	1.875, 3.75, 7.5, 15	0.5% DMSO	-20
Clofibrat [µg/l]	62.5, 125, 250, 500, 1000	0.1% DMSO	-20
Colchicin	10, 20, 40, 80	SW	-20
Hexachlorphen [µg/l]	2, 4, 8, 16, 32	0.1% DMSO	-20
Ibuprofen	2.5, 5, 10, 20, 40, 80	0.1% DMSO	-20
MPP <sup>+</sup>	100, 200, 400, 800, 1600	0.1% DMSO	4
Paracetamol <sup>§</sup>	125, 250, 500, 1000, 2000	SW	RT
Paraquat <sup>§</sup>	125, 250, 500, 1000	SW	4
PCB 180	3.125, 6.25, 12.5, 25	1% DMSO	-20
Rifampicin	50, 100, 200, 400, 800	1% DMSO	-20
Rotenon [µg/l]	2, 4, 8, 16, 32	0.1% DMSO	-20
Sulfisoxazol	50, 175, 250, 500, 1000	1% DMSO	-20
Taxol	6.25, 12.5, 25, 50	1% DMSO	-20
Tebuconazol	1.875, 3.75, 7.5, 15, 30	0.1% DMSO	-20
Tolbutamid	57.3, 71.6, 89.6, 112, 140	1% DMSO	-20
Triphenylphosphat	0.1875, 0.375, 0.75, 1.5, 3	0.1% DMSO	-20

SW: Standardisiertes Wasser; RT: Raumtemperatur; §: Lichtempfindliche Substanz, wurde im Dunklen gelagert

Tabelle 2. Testkonzentrationen der weiteren-Substanzen [mg/l] im FET-Test, sowie das verwendete Medium und Lagertemperatur [°C] der Stammlösungen

<b>Substanzen</b>	<b>Testkonzentrationen</b>	<b>Medium</b>	<b>Lagerung</b>
Carbamazepin*	54.7, 76.5, 107, 150, 210	SW	RT
Kupfer(II)-Sulfat <sup>§</sup>	0.2, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	SW	RT
Dibutylmaleat	0.25, 0.5, 1, 2, 4	SW	4
3,4-DCA	0.5, 1, 2, 3.7, 4, 8	SW	4
Dimethyl sulfoxid [g/l]	10, 17, 28.9, 49.1, 83.5	SW	RT
2,2-Dimethylvaleriansäure	13, 26, 52, 104	0.1% DMSO	4
DNOC <sup>§</sup>	0.2, 0.3, 0.6, 1.1, 1.9	SW	4

Substanzen	Testkonzentrationen	Medium	Lagerung
2,4-DNP <sup>s</sup>	0.6, 1.3, 2.5, 5, 10	SW	4
Ethanol [g/l]	5.3, 8, 12, 18, 27	SW	RT
2-Ethylbuttersäure	12, 23, 46, 93, 116	0.1% DMSO	4
2-Ethylhexansäure	1, 2, 4, 7, 14, 29, 58	0.1% DMSO	4
Hexansäure	61, 72, 87, 104	0.1% DMSO	4
Luviquat <sup>s</sup>	0.1, 0.3, 0.5, 1, 2	SW	4
Malathion	0.5, 1, 2, 4, 8	SW	RT
Merquat	0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6	SW	4
2-Methylhexansäure	16, 33, 65, 130	0.1% DMSO	4
6-Methyl-5-heptene-2-on	6.3, 12.5, 25, 50, 100	SW	4
Methylquecksilber (II) chlorid [ $\mu\text{g/l}$ ]	6.3, 12.5, 25, 50, 100	SW	4
2-Methylpentansäure	21, 31, 47, 70, 105, 157	0.1% DMSO	4
1-Octanol	2.5, 5, 10, 20, 40	SW	4
4-Pentensäure	50, 100, 200	0.1% DMSO	4
Prochloraz	0.5, 1, 2, 4, 8	SW	RT
2-Propylheptansäure	2, 4, 9, 17	0.1% DMSO	4
Natriumchlorid [g/l]	1, 2, 4, 8, 16	SW	RT
STS* <sup>s</sup>	0.2, 0.3, 0.6, 1.3, 2.5	SW	RT
Triclosan	0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2	0.1% EtOH	4
Triethylenglycol [g/l]	20, 30, 45, 101.3	SW	-20
2,3,6-Trimethylphenol	8, 12, 18, 27, 40.5	SW	4
4- <i>En</i> -Valroinsäure	28, 57, 114	0.1% DMSO	4
Valproinsäure	1, 2, 4, 7, 14, 29, 58, 115	0.1% DMSO	4
Zinkpyrithion [ $\mu\text{g/l}$ ]	0.6, 0.8, 1.6, 3.275, 6.35	0.1% DMSO	-20

SW: Standardisiertes Wasser; RT: Raumtemperatur; \*: Um volle Lösung zu gewährleisten, wurde diese Substanz während des Ansetzens erwärmt, bevor die Stammlösung auf Raumtemperatur heruntergekühlt wurde;  $\text{\$}$ : Lichtempfindliche Substanz, wurde im Dunklen gelagert

### 3.1.1 Akute und subletale Toxizität der Substanzen

Tabelle 3 führt die 96 hpf EC- und LC-Werte von 10 und 50% gemäß OECD TG 236 für Testsubstanzen auf, sowie in einigen Fällen bei 120/144 hpf. Bei fünf Substanzen (MPP<sup>+</sup>, PCB 180, Rifampicin, Sulfisoxazol und Taxol) wurden bis 120 hpf keine letalen Effekte festgestellt, auch als Belastungskonzentration bis zur höchsten Löslichkeit in 1% DMSO erhöht wurde. Die Toxizität der meisten Substanzen bei 96 und 120/144 hpf variierte nur geringfügig, wobei z. B. Paraquat eine Ausnahme von dieser Beobachtung bildeten. Obwohl der FET-Test in den letzten Jahren immer mehr an Beliebtheit gewonnen hat, werden die aus diesen Tests resultierenden EC- und LC-Werte in der Literatur nur selten angegeben.

Tabelle 3. Letale und subletale Toxizität [mg/l] der Substanzen im FET-Test, mit ToxRat® errechnet

Substanzen	n	96 hpf				120 hpf / 144 hpf <sup>a</sup>			
		EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>
Acrylamid	4	75.400	94.000	166.600	199.300				
Carbamazepin	3	42.700	81.330	138.760	164.920	53.400	62.600	124.500	147.400
Carbaryl	2	2.200	2.400	6.600	12.200				
Clofibrat	2	200.000	300.000	600.000	1,100.000				
Colchicin	4	23.100	32.400	32.500	41.400				
Kupfer(II) Sulfat	3	0.400	0.700	0.600	0.800	0.200	0.600	0.600	0.800
Dibutylmaleat	3	0.400	0.600	0.500	0.700				
3,4-DCA	3	1.200	1.900	1.600	2.400				
DMSO	3	14,460.000	20,100.000	27,200.000	36,560.000	20,250.000	24,610.000	25,390.000	33,880.000
2,2-Dimethylvaliansäure	2	56.600	64.300	71.700	77.200	54.400	62.500	71.700	77.200
DNOC	3	0.300	0.400	0.400	0.500	0.300	0.400	0.400	0.500
2,4-DNP	3	2.000	2.700	3.400	4.100	1.600	2.400	2.000	2.700
Ethanol	3	5,800.00	7,840.000	8,650.000	11,3000.000				
2-Ethylbuttersäure	3	20.100	47.100	68.500	95.700	32.300	58.300	61.200	83.700
2-Ethylhexansäure	3	5.600	20.800	24.200	40.000	7.200	16.400	24.200	38.200
Hexachlorphen	2	0.004	0.005	0.007	0.008				
Hexansäure	2	62.500	69.400	75.300	76.100	61.900	67.000	74.600	77.200
Ibuprofen	2	4.700	10.800	31.700	37.300				
Luviquat	3	0.300	0.500	0.400	0.900	0.400	0.600	0.300	0.800

Substanzen	n	96 hpf				120 hpf / 144 hpf <sup>a</sup>			
		EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>
Malathion	3	0.800	1.200	2.800	3.500	0.800	1.100	2.000	2.600
Merquat	3	0.200	0.300	0.300	0.500	0.200	0.300	0.200	0.500
2-Methylhexansäure	2	46.500	53.900	75.200	84.100	28.700	42.600	75.300	84.100
6-Methyl-5-hepten-2-on	3	54.500	81.700	76.100	139.700				
Methylquecksilber (II) chlorid	3	0.020	0.030	0.030	0.040	0.0100	0.020	0.030	0.030
2-Methylpentansäure	3	35.900	53.500	59.800	77.000	43.200	54.400	52.300	67.800
MPP <sup>+</sup>	3	Bis 1% DMSO Löslichkeit keine Effekte beobachtet <sup>b</sup>							
1-Octanol	3	8.700	12.400	13.700	18.900	10.100	15.100	13.200	18.40 <sup>0</sup>
Paracetamol	2	200.000	300.000	1000.000	1200.000				
Paraquat	2	328.700	353.200	933.800	1,161.400	384.700	545.900	721.100	855.000
4-Pentensäure	2	52.100	60.200	90.800	107.100	52.200	60.100	63.500	103.500
PCB 180	3	Bis 1% DMSO Löslichkeit keine Effekte beobachtet <sup>b</sup>							
Prochloraz	3	1.700	3.800	2.300	4.500	1.500	3.200	2.200	4.300
2-Propylheptansäure	3	3.400	4.100	10.000	13.500	2.400	3.100	8.900	11.500
Rifampicin	3	Bis 1% DMSO Löslichkeit keine Effekte beobachtet <sup>b</sup>							
Rotenon	2	0.004	0.007	0.006	0.010				
Natriumchlorid	3	1,090.00	3,370.000	2,860.000	5,910.000				
STS	3	0.300	0.300	0.300	0.300	0.200	0.300	0.300	0.300
Sulfisoxazol	3	Bis 1% DMSO Löslichkeit keine Effekte beobachtet <sup>b</sup>							

Substanzen	n	96 hpf				120 hpf / 144 hpf <sup>a</sup>			
		EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>
Taxol	3	Bis 1% DMSO Löslichkeit keine Effekte beobachtet <sup>b</sup>							
Tebuconazol	2	2.300	5.300	15.000	17.300				
Tolbutamid	2	54.300	116.900	223.200	278.600				
Triclosan	3	0.100	0.200	0.200	0.300				
Triethylenglycol	3	31,220.000	35,700.000	45,220.000	54,220.000	<i>26,400.000</i>	<i>32,300.000</i>	<i>45,000.000</i>	<i>52,200.000</i>
2,3,6-Trimethyl phenol	3	9.800	12.300	10.500	14.100				
Triphenylphosphat	2	0.300	0.500	1.400	1.600				
4-En-Valproinsäure	2	24.700	37.400	41.900	56.100	28.400	33.100	49.800	68.900
Valproinsäure	3	3.100	9.100	26.200	56.900	6.200	11.800	33.300	62.700
Zincpyrithion	3	0.002	0.005	LC > Löslichkeitsgrenze					

<sup>a</sup> Daten für 144 hpf in *kursiv*

<sup>b</sup> Für Löslichkeitsdaten, siehe Annex II Tabellen 1 und 2

Häufiger werden jedoch Belastungskonzentrationen, Einzelwerte oder Konzentrationen von Interesse angegeben. Ein Beispiel: Von den 48 hier vorgestellten Chemikalien wurde der LC<sub>50</sub>-Wert nur für sechs davon veröffentlicht. Außerdem war der EC<sub>50</sub>-Wert nur für eine der Substanzen verfügbar.

Tabelle 4 fasst alle Beobachtungen zusammen, die während der Analyse der morphologischen Endpunkte aufgezeichnet wurden. Der bei mit Hexachlorphen belasteten Embryonen beobachtete Gastrulationsstillstand wurde hier als Untertyp des OECD TG 236 Endpunktes "Koagulation" angesehen (OECD, 2013). Darüber hinaus wurde der vierte in der OECD TG 236 aufgeführte Endpunkt („Fehlender Herzschlag“) in „teilweise oder vollständig fehlender Herzschlag oder Blutfluss“ sowie „Blutstau in erweiterten Blutgefäßen“ unterteilt. Die Exposition gegenüber z. B., 2,2-Dimethylvaleriansäure, Hexansäure, 2-Propylheptansäure und 4-*En*-Valproinsäure induzierte eine Vielzahl der Endpunkte (jeweils 18, 18, 17 und 19 Endpunkte). Auch Valproinsäure induzierte diverse Endpunkte, einschließlich Deformation des Dotters und reduzierte Resorption, verminderte Pigmentierung, Lordose, Kraniofazialdeformationen und elf Weitere. Andere Substanzen induzierten nur wenige Veränderungen, mit signifikanter Variierung im Schweregrad, wie 2,4-Dinitrophenol (6 Endpunkte), Luviquat (6), Malathion (7), Merquat (7), Natriumchlorid (7) und Triclosan (6). Schließlich wurde festgestellt, dass die Belastung mit MPP<sup>+</sup>, PCB 180, Rifampicin, Sulfoxazol und Taxol keine letalen Endpunkte hervorrief und nur in einigen Fällen subletale Wirkungen auftraten (Tabelle 3). Einige der beobachteten Entwicklungsveränderungen wurden durch viele der getesteten Substanzen hervorgerufen. Wie in Tabelle 4 dargestellt, konnte bei allen effektinduzierenden Substanzen die Bildung von Ödemen beobachtet werden. Daher scheinen Ödeme im Zebraabrling von geringem mechanistischem Wert zu sein und müssen daher als unspezifischer allgemeiner Effekt der Toxizität eingestuft werden (Horie u. a., 2017; Jeffries u. a., 2015), obwohl Ödeme als typische Effekte der Kardiotoxizität angesehen wurden (Incardona und Scholz, 2016). Tatsächlich wurden Ödeme unter anderem auch durch Petroleumöle (Cherr u. a., 2017), Parabene (Bereketoglu und Pradhan, 2019), Nanomaterialien (Shaw u. a., 2016), endokrine Disruptoren (Moreman u. a., 2017), Pestizide (Awoyemi u. a., 2019) und Flammschutzmittel (Parsons u. a., 2019; Zezza u. a., 2019) induziert. Des Weiteren wurde festgestellt, dass physikalisch-chemische Parameter wie beispielsweise Temperatur ebenfalls Ödeme bei Zebraabrlings-Embryonen induzieren können (Pype u. a., 2015). Andere Endpunkte, wie Otolithendeformation und Augenmissbildungen, wurden von vier bzw. sechs der getesteten Chemikalien verursacht. Otolithendeformation wurde bisher nur nach Belastung mit Bisphenol A (Gibert u. a., 2011), Carbamazepin, Diclofenac, Metoprolol (van den Brandhof und Montforts, 2010), Ethanol und Acetaldehyd (Reimers u. a., 2004) berichtet, während z.B. Augenfehlbildungen häufiger beobachtet werden.

Tabelle 4. Zusammenfassung der morphologischen Effekte im Zebraärblings-Embryo nach 96 hpf oder 120/144 hpf im FET-Test

Substanzen	Koagulation	Gastrulations-Stillstand	Schwanz nicht abgelöst	Somiten Deformation	Tw. fehlender Herzschlag	Tw. fehlender Blutfluss	Blutstau	Ödeme	Reduzierte Entwicklung	Verspätetes Schlüpfen	Verm. Pigmentierung	Tw. Dotter Resorption	Dotterdeformation	Flossenentwicklung verm.	Spontanbewegung verm.	Tremor (> 96 hpf)	Kraniofazialdeformation	Otolithebdeformation	Augendeformation	Wirbelsäulendeformation	Lordose	Kyphose	Skoliose
Acrylamid	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	■	■	■	□	□	■	■	□	□
Carbamazepin	□	□	□	■	■	■	□	■	□	■	□	□	□	□	■	□	■	□	□	■	⌘	⌘	⌘
Carbaryl	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	□	■	■	□	□	□	■	■	□	□
Clofibrat	■	□	□	□	■	■	■	■	■	□	■	□	■	□	■	■	■	□	■	■	■	□	□
Colchicin	■	□	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	□	■	□	□	■	□	□	■	■	□	□
Kupfer(II) sulfat	■	□	□	□	■	■	□	■	■	■	□	□	□	■	□	□	□	□	□	■	⌘	⌘	⌘
Dibutyl maleate	■	□	■	□	■	■	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	■	⌘	⌘	⌘
3,4-DCA	■	□	■	■	■	■	□	■	■	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	■	⌘	⌘	⌘
DMSO	■	□	■	□	■	■	□	■	■	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	■	⌘	⌘	⌘
2,2-Dimethylvaleriansäure*	■	□	□	□	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■
DNOC	■	□	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□	□	□	□	□	■	□	□	■	⌘	⌘	⌘
2,4-DNP	□	□	■	□	■	■	□	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	⌘	⌘	⌘
Ethanol	■	□	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	⌘	⌘	⌘
2-Ethylbuttersäure*	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	■	□	□	■	□	□	■	■	■	■	■	□	■
2-Ethylhexansäure*	■	□	■	□	■	■	■	■	□	■	□	■	■	■	□	■	■	□	■	■	■	□	■
Hexachlorphen	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	□	■	□	□	■	■	■	□
Hexansäure*	■	□	■	□	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■



Substanzen	Koagulation	Gastrulations-Stillstand	Schwanz nicht abgelöst	Somiten Deformation	Tw. fehlender Herzschlag	Tw. fehlender Blutfluss	Blutstau	Ödeme	Reduzierte Entwicklung	Verspätetes Schlipfen	Verm. Pigmentierung	Tw. Dotter Resorption	Dotterdeformation	Flossenentwicklung verm.	Spontanbewegung verm.	Tremor (> 96 hpf)	Kraniofazialdeformation	Otolithebedeformation	Augendeformation	Wirbelsäulendeformation	Lordose	Kyphose	Skoliose
Rotenon	■	□	■	□	■	■	□	■	■	■	■	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□
Natriumchlorid	■	□	■	□	■	■	□	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	\$	\$	\$
STS	■	□	■	■	■	■	□	■	■	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	■	\$	\$	\$
Sulfisoxazol <sup>#</sup>	□	□	■	□	□	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	■	□	□	■	■	□	□
Taxol <sup>#</sup>	□	□	■	□	□	■	■	■	■	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	■	□	■	□
Tebuconazol	■	□	■	□	■	■	□	■	■	■	■	□	□	□	■	□	■	□	□	■	■	□	□
Tolbutamid	□	□	■	□	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■	□	■	■	□	□	■	■	□	□
Triclosan	■	□	■	■	■	■	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	\$	\$	\$
Triethylenglycol	■	□	■	□	■	■	□	■	■	■	□	□	□	□	□	□	■	□	■	■	\$	\$	\$
2,3,6-Trimethylphenol	■	□	■	□	■	■	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	■	\$	\$	\$
Triphenylphosphat	■	□	■	□	■	■	□	■	■	■	□	■	□	□	■	□	■	□	□	■	■	□	□
4-En-Valproinsäure*	■	□	■	□	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□
Valproinsäure*	■	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■
Zinkpyrithion <sup>#</sup>	□	□	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	□	■	□	□	□	□	■	■	□	□	□

Die vier OECD TG 236 Endpunkte sind in **fett** angegeben; Tw.: Teilweise; Verm.: vermindert(e); Schwarzes Kästchen (■): häufig beobachteter Endpunkt und/oder bei <LC<sub>10</sub> Konzentrationen; Weißes Kästchen (□): Effekt wurde hier nicht induziert; \*: Diese Substanz wurde bis 120 oder 144 hpf (cf. Tabelle 3) getestet; #: Substanzen wiesen keine akute Letalität is zur 1% DMSO Löslichkeitsgrenze auf; \$: Wirbelsäulendeformation wurde bei dieser Substanz nicht weiter unterteilt.

### 3.1.2 Die Normalentwicklung des Zebrafisch-Embryos

Die Abbildungen 5-9 zeigen die normale Entwicklung des Zebrafisch-Embryos in den ersten 120 hpf. Nach 24 Stunden ist die grundlegende Physiologie des Embryos bereits sichtbar und anatomische Strukturen wie Somiten, Notochord, Otolithen und die Augenanlage sind sichtbar (Abbildung 5). Die Körperlänge kann bereits gemessen werden, und der Embryo zeigt erste Bewegungen in Form von Schwanz-Coiling. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die bis 48 hpf gebildeten Strukturen. In diesem Stadium kann eine Dechorionierung durchgeführt werden (Henn und Braunbeck, 2011), um einen besseren Zugang zum Embryo zu erhalten. Nach 48 hpf können die kraniofazialen Merkmale der Knorpelstrukturen beurteilt (Strecker u. a., 2013), und auch der Blutfluss und das Herz beobachtet werden. Ebenso sind Organe wie die Augen voll entwickelt und verschiedene Komponenten des Gehirns und der Wirbelsäule oberhalb des Notochords können unterschieden werden. Der Embryo zeigt eine zunehmende Anzahl von epidermalen Pigmentzellen und die Schwanz- und Brustflossen werden langsam sichtbar. Nach 72 hpf ist die Gesamtanatomie weitgehend entwickelt und die Embryonen schlüpfen (Abbildung 7). Das Herz ist jetzt S-förmig, und die nun geradlinige Wirbelsäule erlaubt die Bestimmung von z.B. Lordose, Skoliose oder Kyphose. Die Flossen haben sich weiterentwickelt, und nach dem Schlüpfen können die ersten Verhaltensänderungen, die auf aktivem Schwimmen beruhen, beobachtet werden. Nach 96 hpf sollten alle Embryonen geschlüpft sein, die Resorption hat den Dottersack deutlich reduziert, die Schwimmblase hat sich gebildet und der Darmtrakt ist voll entwickelt (Abbildung 8). Nach 120 hpf (Abbildung 9) haben die Embryonen den Dottersack fast vollständig resorbiert, und die Gesichtsstrukturen haben sich für den Beutefang abgeflacht (Belanger u. a., 2010).

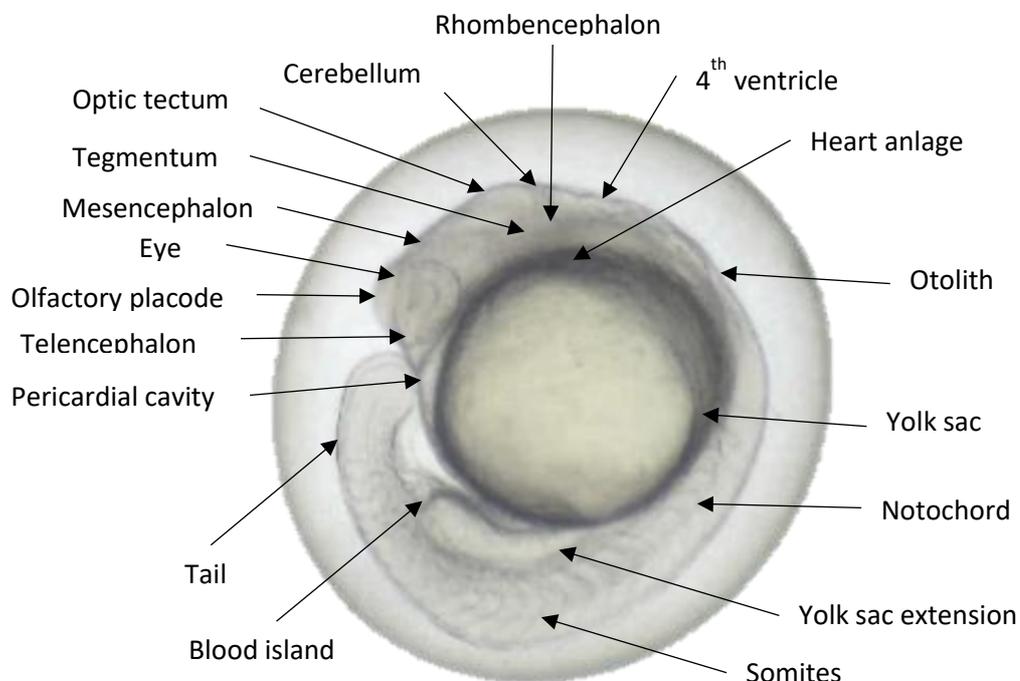


Abbildung 5. Normalentwickelter Zebrafisch-Embryo nach 24 hpf

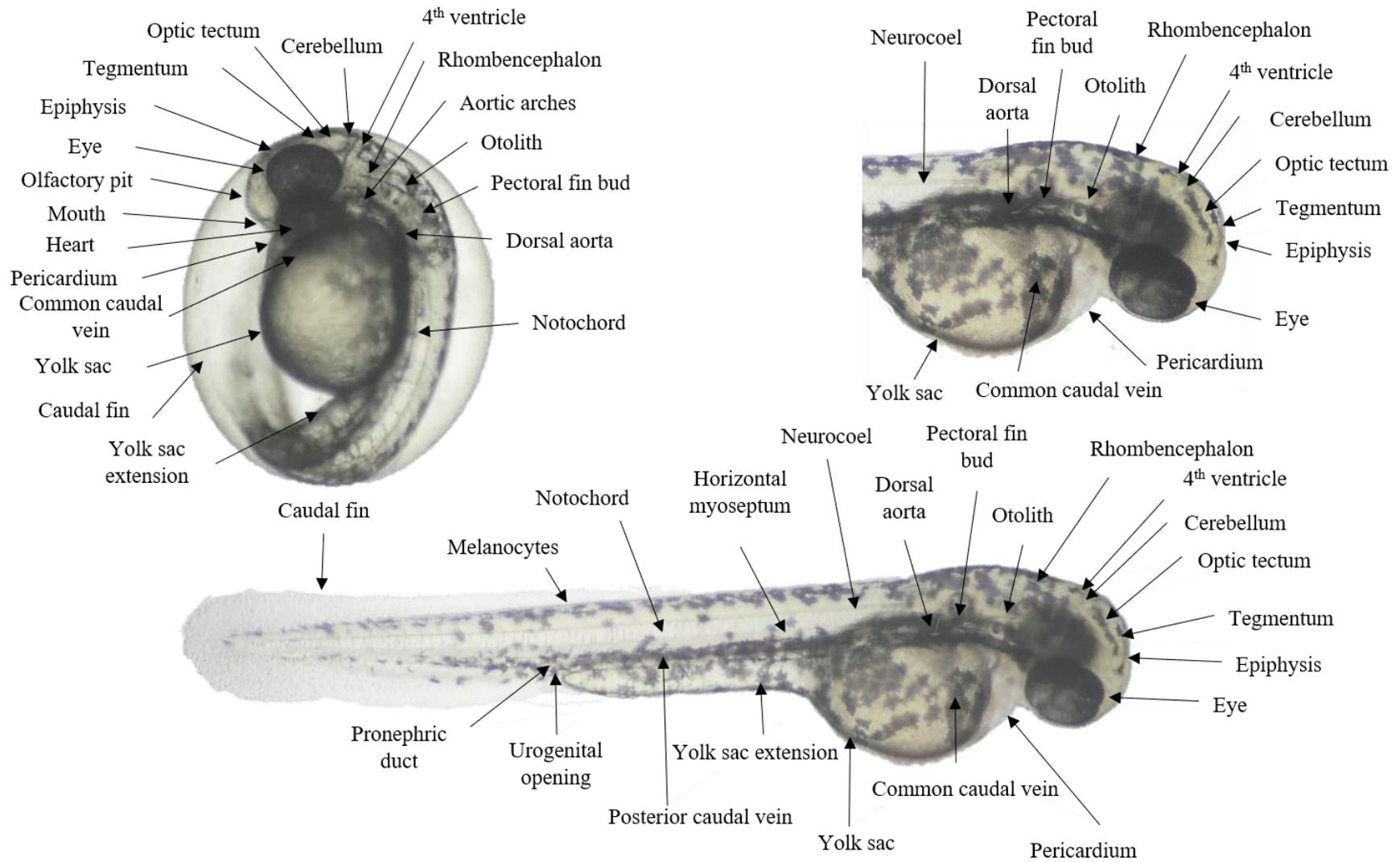


Abbildung 6. Normalentwickelter Zebrafärbliings-Embryo nach 48 hpf

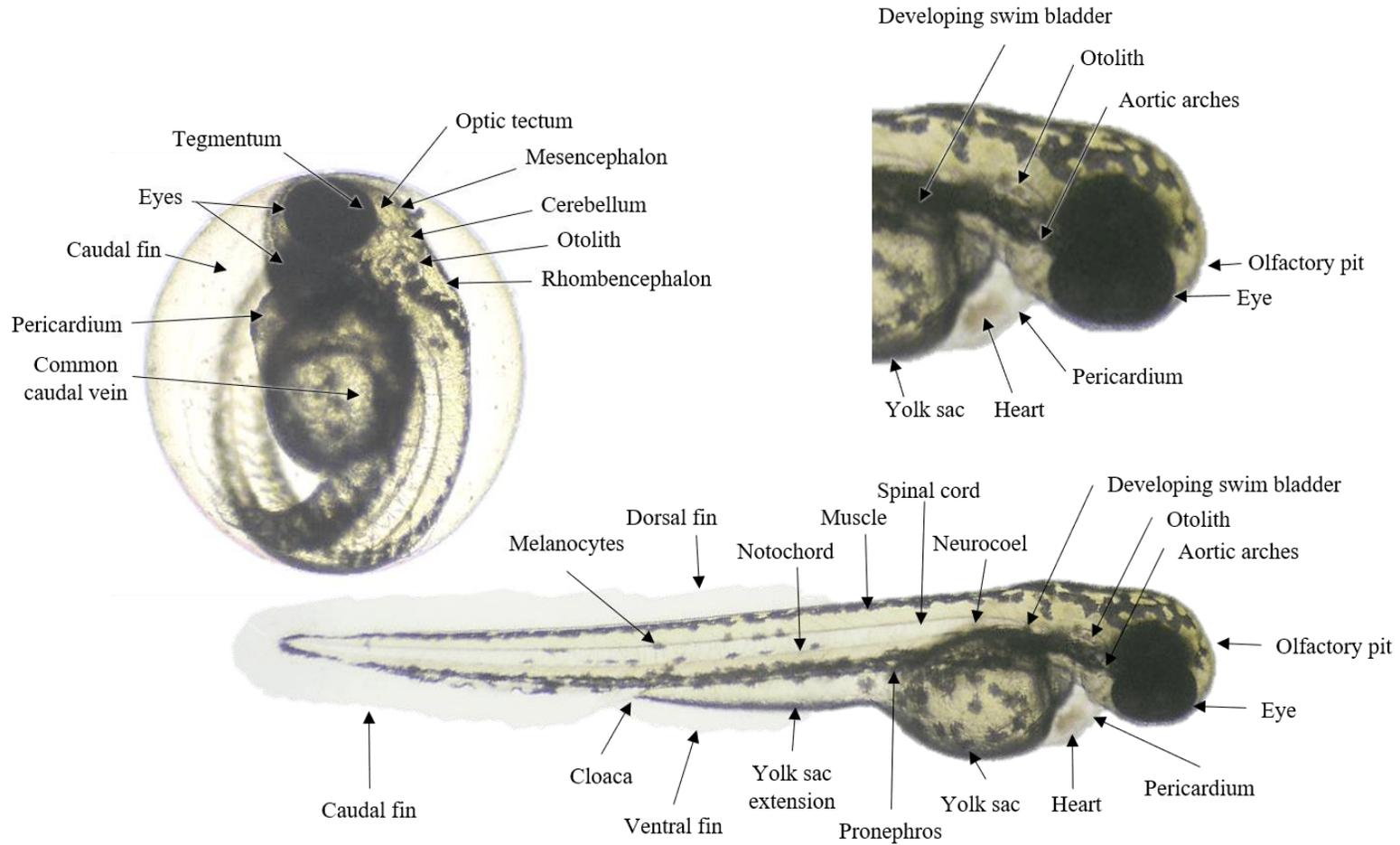


Abbildung 7. Normalentwickelter Zebrafish-Embryo nach 72 hpf

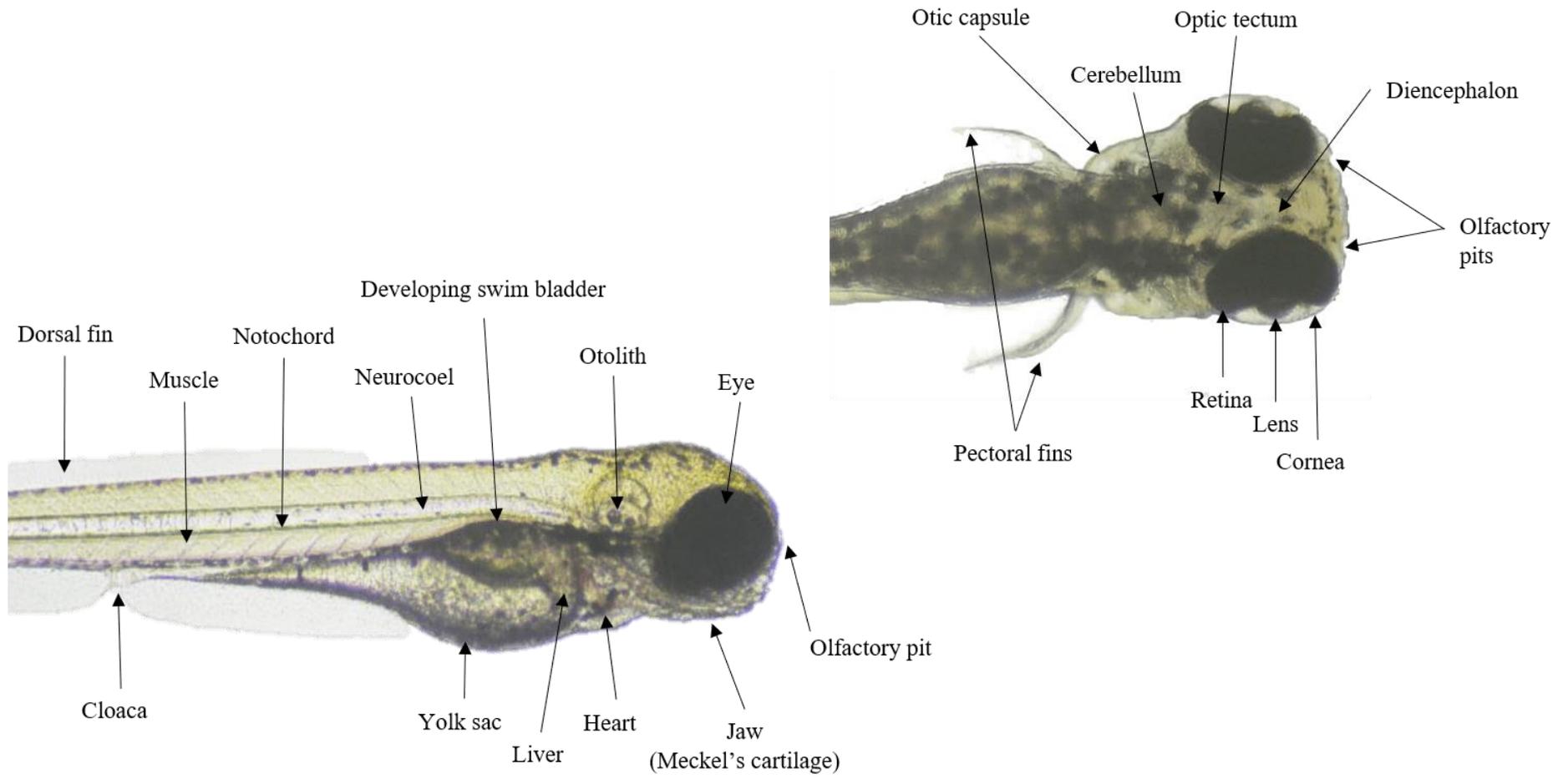


Abbildung 8. Normalentwickelter Zebrafisch-Embryo nach 96 hpf

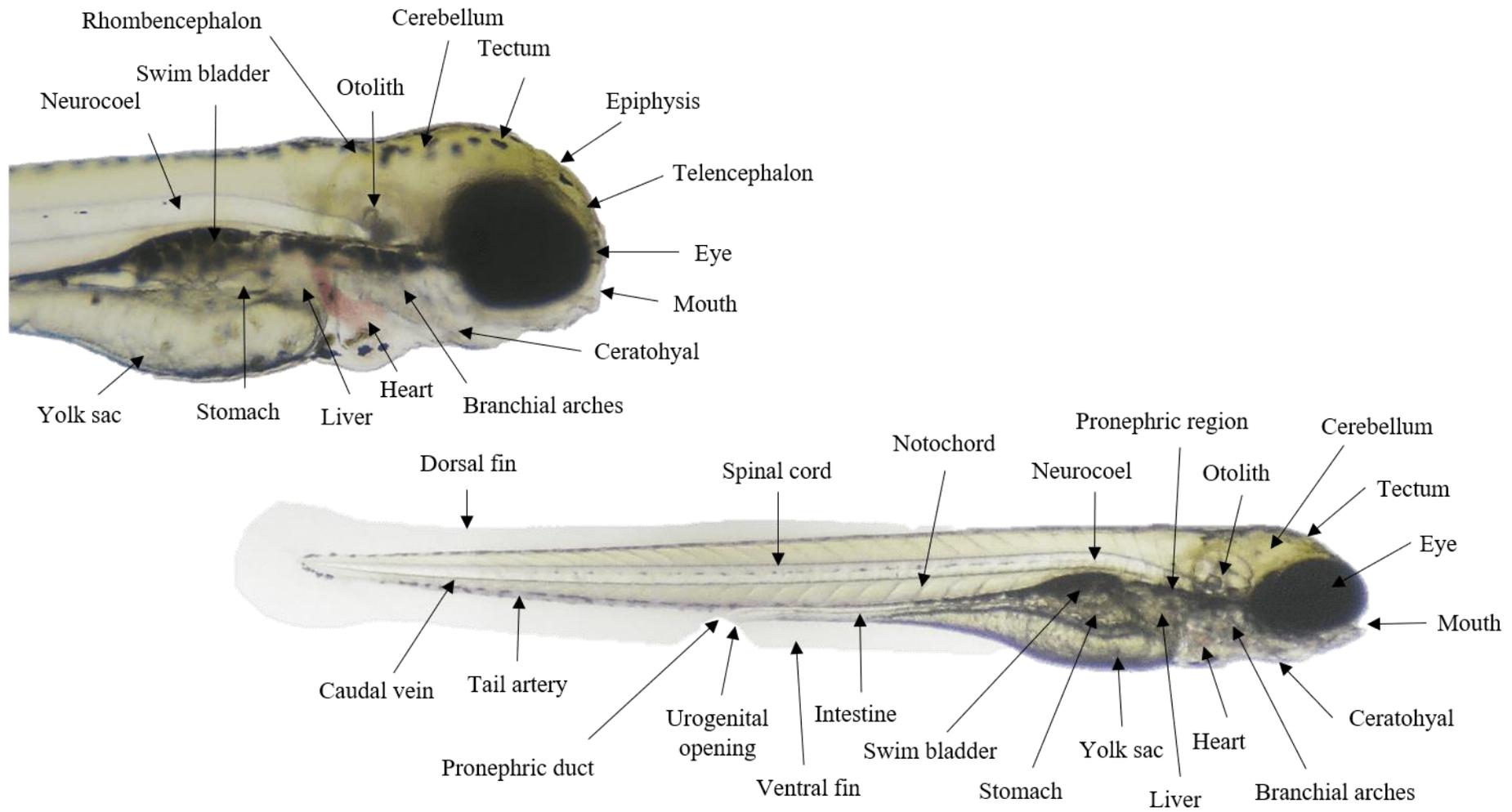


Abbildung 9. Normalentwickelter Zebrabärblings-Embryo nach 120 hpf

### 3.1.3 Entwicklungsstörungen im Zebrabärblings-Embryo

Alle Entwicklungsveränderungen, die während des FET-Tests beobachtet wurden, sind in den Abbildungen 10-13 zusammengefasst. Abbildung 10 zeigt drei der OECD TG 236 Endpunkte: Koagulation, Gastrulationsstillstand, Fehlende Schwanzablösung und Somitendeformation. Die Koagulation tritt in der Regel nach 24 hpf auf und ist ein Indikator für den frühen Tod; selten wird die Koagulation in späteren Entwicklungsstadien gesehen (Abbildung 10A). Nur Colchicin stellte hier eine Ausnahme dar, da belastete Embryonen neben einem verringerten Herzschlag und Blutfluss in späteren Entwicklungsstadien an Schwanz und Dottersack beginnende Koagulation aufwiesen (Abbildung 10B). Der Gastrulationsstillstand wird oft als Vorläufer der Koagulation angesehen, kann aber bei Embryonen mit stark verzögerter Entwicklung, einem subletalen Endpunkt, beobachtet werden (Abbildung 10C). Fehlende Schwanzablösung tritt ebenfalls in der frühen Entwicklung auf und kann entweder auf eine verzögerte Entwicklung hinweisen oder in schweren Fällen als letal angesehen werden (Abbildung 10D-F). Die OECD TG 236 betrachtete darüber hinaus die fehlende Somitenbildung als einen Endpunkt der akuten Toxizität, welcher ab 24 hpf beobachtet werden kann. Das Insert in Abbildung 10G zeigt ein allmähliches Verschwinden der Pylonen förmigen Somiten (dM) oberhalb des Dottersacks (YS) in unorganisiertes Gewebe. Nach Manipulation der Fokusebene waren weiterhin Brüche im Spinalstrang zu beobachten (Abbildung 10H insert). Es ist bekannt, dass Somiten an der Entwicklung von Wirbeln, Rippen, Skelettmuskeln und Haut beteiligt sind (Venzin und Oates, 2020), welches die Wichtigkeit der korrekten Ausbildung der Somiten unterstreicht. Obwohl das OECD-Protokoll für den FET-Test die Somitenbildung explizit als zentralen Endpunkt nennt, finden sich in der Literatur kaum Hinweise darauf (Hallare u. a., 2004; Li u. a., 2016; Mendis u. a., 2018; Oliveira u. a., 2009). Tatsächlich wird angenommen, dass nur Brannen u. a. (2010) die Anzahl der im Zebrabärblings-Embryo entwickelten Somiten aufgezeichnet haben.

Abbildung 11 zeigt häufig beobachtete subletale Endpunkte mit Erholungspotenzial. Blutstauungen, die durch die Anhäufung von Blutzellen, insbesondere in Perikard- (Abbildung 11A) und Dotterödemen (Abbildung 11B), gekennzeichnet sind, werden häufig zusammen mit einer stark reduzierten Durchblutung und Herzfrequenz beobachtet. Ödeme werden als durch Flüssigkeitsansammlungen verursachte Schwellungen definiert (IQWiG 2016). Leider gehen einige Autoren (z. B. Brannen et al., 2010) nicht im Detail auf kardiovaskuläre Effekte ein und fassen sie stattdessen z. B. als "kardiovaskuläre Funktion" und "Herzfrequenz" zusammen, welches einen direkten Vergleich der Ergebnisse erschwert. Die Entwicklung des kardiovaskulären Systems des Zebrabärblings wurde bereits detailliert in der Literatur beschrieben (Berndt u. a., 2014; Huang u. a., 2018; Y. X. Li u. a., 2003) und die Beeinträchtigung z. B. der Herzschleifenformation (Abbildung 11C) auf oxidativen Stress (Ni u. a., 2020), reduzierten Lipidstoffwechsel (Huang u. a., 2018), veränderte Zellmigrationsmuster (Berndt u. a., 2014; Y. X. Li u. a., 2003) zurückgeführt. Im (öko-)toxikologischen Kontext sind solche Beobachtungen jedoch selten diskutiert worden (Manjunatha u. a., 2020).

### Core endpoints of (acute) toxicity (OECD TG 236)

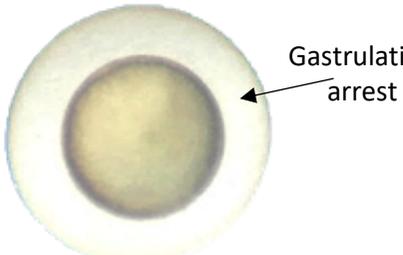
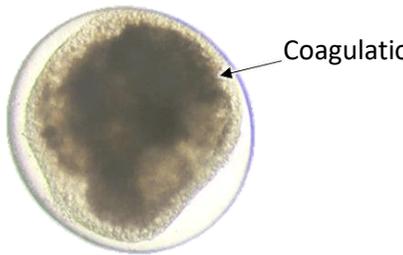
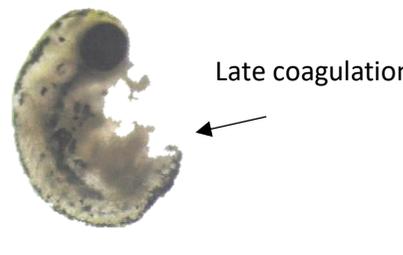
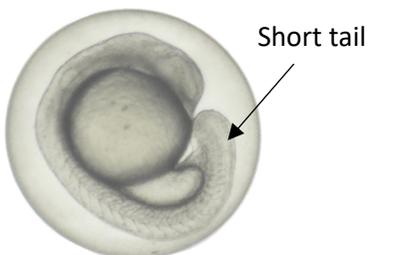
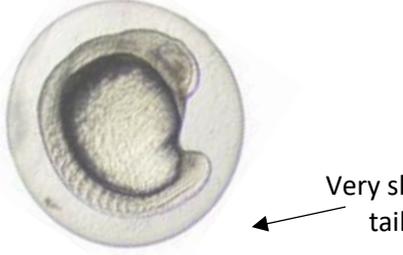
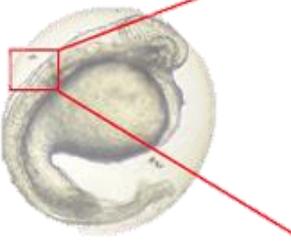
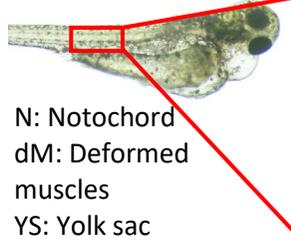
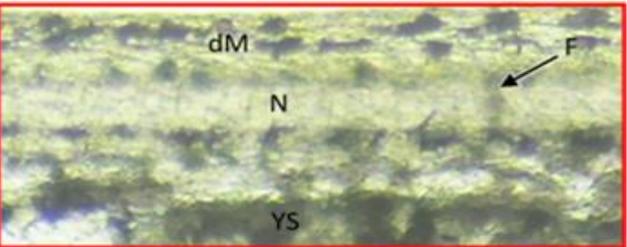
Coagulation & gastrulation arrest	<p><b>A</b> - 6 µg/l Hexachlorophene at 24 hpf</p>  <p>Gastrulation arrest</p>	<p><b>B</b> - 4 mg/l 3,4-DCA at 24 hpf</p>  <p>Coagulation</p>	<p><b>C</b> - 40 µg/l Colchicine at 96 hpf</p>  <p>Late coagulation</p>	
Lack of tail detachment	<p><b>D</b> - 9 mg/l 2-Propylheptanoic acid at 24 hpf</p>  <p>Short tail</p>	<p><b>E</b> - 116 mg/l 2-Ethylbutyric acid at 24 hpf</p>  <p>Very short tail</p>	<p><b>F</b> - 43 mg/l 2-Propylheptanoic acid at 24 hpf</p>  <p>No tail</p>	
Somite malformation	<p><b>G</b> - 15 mg/l Carbaryl at 48 hpf</p>   <p>dM YS</p>		<p><b>H</b> - 70 mg/l 2-Methylpentanoic acid at 120 hpf</p>   <p>N: Notochord dM: Deformed muscles YS: Yolk sac</p> <p>dM N YS F</p>	

Abbildung 10. OECD TC 236 Kernendpunkte. **A:** Gastrulationsstillstand nach 24 hpf, 16 mg/l Hexachlorphen. **B:** Koagulation eines befruchteten Embryos nach 24 hpf, 4 mg/l 3,4-DCA. **C:** Späte Koagulation nach 96 hpf, 40 µg/l Colchicin. **D:** Geringfügig reduzierte Schwanzablösung nach 24 hpf, 9 mg/l 2-Propylheptansäure. **E:** Kaum abgelöster Schwanz nach 24 hpf, 116 mg/l 2-Ethylbuttersäure. **F:** Keine Schwanzablösung nach 24 hpf, 43 mg/l 2-Propylheptansäure. **G:** Reduzierte Somitenbildung (dM) nach 48 hpf, 15 mg/l Carbaryl. **H:** Notochord-Bruch (F) und dM nach 120 hpf, 7 mg/l 2-Methylpentansäure

Common sub-lethal endpoints with regeneration potential

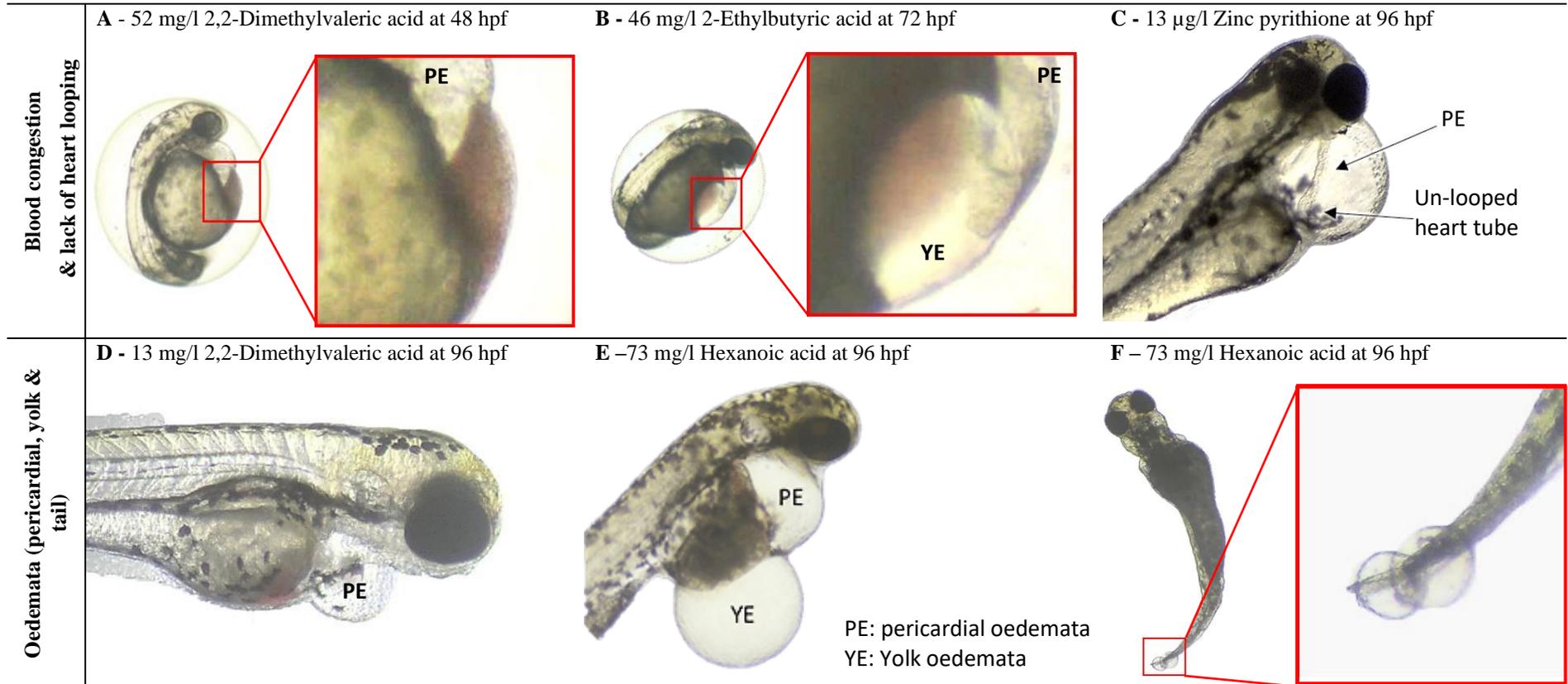
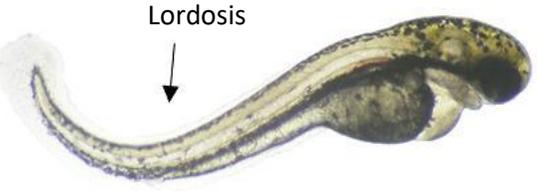
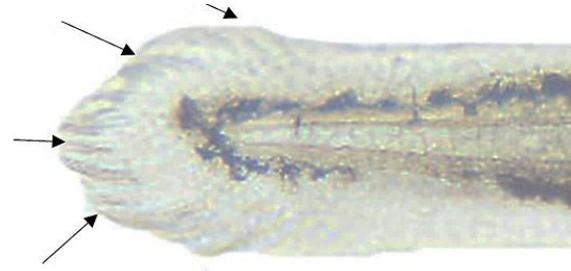
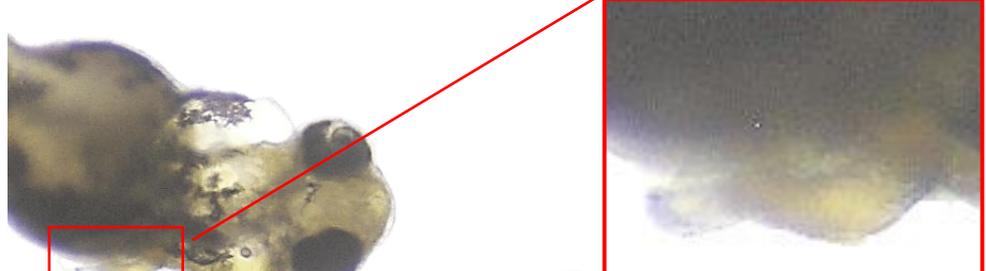


Abbildung 11. Subletale Endpunkte mit Regenerationspotenzial. **A:** Blutstau am Dotter und an den Perikarödemen nach 48 hpf, 52 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **B:** Blutstau am Dotter, und Dotter- und Perikardödemen nach 72 hpf, 46 mg/l 2-Ethylbuttersäure. **C:** Perikardödeme und fehlende Herzschleife nach 96 hpf, 13 µg/l Zinkpyrithion. **D:** Perikardödeme nach 96 hpf, 13 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **E:** Perikard- und Dotterödeme nach 96 hpf, 73 mg/l Hexansäure. **F:** Schwanzödeme nach 96 hpf, 73 mg/l Hexansäure

In leichten Fällen ähneln Perikard Ödeme einem vergrößerten Perikard (Abbildung 11D), in schweren Fällen sind sie als erweiterter, dünnwandiger Hohlraum um das Herz zu erkennen (Abbildung 11E: PE). Dotterödeme entwickeln sich entweder im Dotter oder an der Außenseite des Dottersacks (Abbildung 11E: YE). Darüber hinaus sind Ödeme nicht auf die Perikard- und Dotterregion beschränkt und können am gesamten Körper auftreten (Abbildung 11F). Dotter- und Perikard Ödeme gehörten hier zu den an den häufigsten beobachteten Endpunkten und werden daher als unspezifisch angesehen (Tabelle 4). Außerdem wurden sie in der Literatur häufig erwähnt (z. B. Lee et al., 2020; Meneghetti et al., 2020; Pennanen et al., 2000), und einige Autoren unterschieden zwischen verschiedenen Ödemen (Yamashita u. a., 2014).

Subletale Endpunkte mit geringem Regenerationspotential werden in Abbildung 12 dargestellt. Es können drei Arten der Wirbelsäulenverkrümmung unterschieden werden: (1) Lordose, eine nach innen gekrümmte Wirbelsäule (Abbildung 12A), (2) Kyphose, eine nach außen gekrümmte Wirbelsäule (Abbildung 12B), und (3) Skoliose, eine seitwärts gekrümmte Wirbelsäule (Abbildung 12C). Hierbei handelt es sich um drei deutlich unterschiedliche Pathologien und sollten als solche behandelt werden. Die Lordose ist die in der Literatur am häufigsten beschriebene Fehlbildung (Labonty u. a., 2017; Matson u. a., 2008; Seok u. a., 2006; Xu u. a., 2011). Da es jedoch keine einheitliche Terminologie gibt, wurde der Begriff "Lordose" häufig verwendet, um verschiedene Arten der Krümmung der Wirbelsäule zu beschreiben (z. B. Issa u. a., 2019). Während Lordose häufig korrekt beschrieben wird, kommt es vor, dass z. B. Skoliose als "Wirbelsäulenflexion (Schwanzdefekt)" bezeichnet wird, und etwas als "Kyphose" definiert wurde, obwohl es ein Bruch des Notochords zu sein scheint (Şişman und Geyikoğlu, 2008). In anderen Fällen wurden mit Begriffen wie "veränderte Struktur der Chorda", "Körperform" (Brannen u. a., 2010), "Notochord Anomalien", "Schwanzanomalien" und "Knicke (gewellt, gekräuselt, gebogen)" für die Beschreibung von Spinalfehlbildungen ohne weitere Unterscheidungen verwendet (Yamashita u. a., 2014). Bei der Arbeit an der vorliegenden Dissertation wurden Wirbelsäulenverkrümmungen häufig im FET-Test beobachtet, wobei die Literatur weitere Beispiele liefert (Li u. a., 2019; Liu u. a., 2016; Rangasamy u. a., 2018; Sun und Liu, 2017; Yan u. a., 2019; X. Yang u. a., 2018; Zezza u. a., 2019; Zou u. a., 2017). Allerdings gibt es keine weiteren Publikationen, welche die unterschiedlichen Krümmungen im Zebrabärbling und den zugrundeliegenden Mechanismen beschreiben. Weitere Endpunkte mit geringem Regenerationspotential sind eine beeinträchtigte Flossenentwicklung, z.B. das Ausfransen der Schwanzflosse (Abbildung 12D), und unterentwickelte Brustflossen (Abbildung 12E). In der Literatur wurden solche Effekte üblicherweise unter "Flossenmorphologie", "Schwanzmorphologie" (Brannen u. a., 2010) und "Schwanzmissbildung" (Beker van Woudenberg u. a., 2014) zusammengefasst, wobei nicht zwischen Veränderungen des Knorpels/Knochens und der Flosse(n) unterschieden wird. Weitere Endpunkte sind eine reduzierte Augenentwicklung (Abbildung 12F, G) und Otolithenbildung (Abbildung 12H). In der Literatur werden diese Endpunkte üblicherweise ohne weitere Angaben als "Augenmissbildung" oder "Fehlende Augen und Otolithen" bezeichnet (Teixidó u. a., 2019; Yamashita u. a., 2014).

Frequent sub-lethal observations with little to no regeneration potential

<p>Lordosis, kyphosis &amp; scoliosis</p>	<p><b>A</b> - 58 mg/l Valproic acid at 120 hpf</p>  <p>Lordosis</p>	<p><b>B</b> - 200 µg/l 2-Ethylhexanoic acid at 72 hpf</p>  <p>Kyphosis</p>	<p><b>C</b> - 104 mg/l 2,2-Dimethylvaleric acid at 120 hpf</p>  <p>Scoliosis</p>
<p>Impaired fin development</p>	<p><b>D</b> - 70 mg/l 2-Methylpentenoic acid at 96 hpf</p> 	<p><b>E</b> - 9 mg/l 2-Propylheptanoic acid at 120 hpf</p> 	
<p>Eye &amp; otolith deformation</p>	<p><b>F</b> - 52 mg/l 4-Pentenoic acid at 72 hpf</p>  <p>Lack of eye</p>	<p><b>G</b> - 285 mg/l 2,2-Dimethylvaleric acid at 72 hpf</p>  <p>Small eye</p>	<p><b>H</b> - 13 mg/l 2,2-Dimethylvaleric acid at 96 hpf</p>  <p>Deformed otolith</p>

<b>Craniofacial malformation</b>	<b>I - 58 mg/l 2,2-Dimethylvaleric acid at 120 hpf</b>	<b>J - 17 mg/l 2-Propylheptanoic acid at 120 hpf</b>
		

Abbildung 12. Subletale Endpunkte mit geringem/keinem Regenerationspotential. **A:** Lordose nach 120 hpf, 58 mg/l Valproinsäure. **B:** Kyphose nach 72 hpf, 200 µg/l 2-Ethylhexansäure. **C:** Skoliose nach 120 hpf, 104 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **D:** Schwanzflossen ausfransen nach 96 hpf, 70 mg/l 2-Methylpentensäure. **E:** Deformierte Schwanzflosse nach 120 hpf, 9 mg/l 2-Propylheptansäure. **F:** Fehlendes Auge nach 72 hpf, 52 mg/l 4-Pentensäure. **G:** Stark reduzierte Augenentwicklung nach 72 hpf, 285 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **H:** Deformierte und reduzierte Otolithenbildung nach 96 hpf, 13 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **I:** Kieferdeformation nach 120 hpf, 58 mg/l 2,2-Dimethylvaleriansäure. **J:** Kieferverformung nach 120 hpf, 17 mg/l 2-Propylheptansäure

Da das Auge des Zebrabärblings ab 28 hpf ausdifferenzierte Zellen enthält, welche über den Sehnerv mit dem Gehirn verbunden sind (Morris und Fadool, 2005), kann seine Entwicklung schon sehr früh beeinträchtigt werden. Andere Kraniofazialdeformationen (Abbildung 12I, J) sind schwerer zu erfassen, da die Beobachtung in der Regel durch aktives Schwimmen und die Körperposition behindert wird. Andere verwendeten jedoch Begriffe wie "Kiefermissbildung" (Teixidó u. a., 2019); "Gesichtsstrukturmorphologie", "Kiefer- und Pharyngealbogenmorphologie" (Brannen u. a., 2010) und "Unterkieferanomalien" (Yamashita u. a., 2014). Es wurde ein Zusammenhang zwischen Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibition und kraniofazialen Fehlbildungen (Kong u. a., 2014; Pillai u. a., 2004; Rao und LaBonne, 2018) sowie Neuralrohrdefekten (Gurvich u. a., 2005; Massa u. a., 2005; Menegola u. a., 2005; Murko u. a., 2013) festgestellt. Diese Beobachtungen sind in Adverse Outcome Pathways (AOPs) eingeflossen und unterstreichen die Verbindung zwischen den Beobachtungen bei Säugetieren und Zebrabärblingen

Abbildung 13 zeigt Beispiele für weniger häufig beobachtete, subletale Endpunkte. Dazu gehören Dotterveränderungen, die ab 48 hpf festgestellt werden können (Abbildung 13A). Ab 96 hpf ist eine reduzierte Dotterresorption gut zu beobachten, da gesunde Embryonen sich von dem Dotter ernähren und dieser dadurch sichtbar zu schrumpfen beginnt (Abbildung 13B, C). Hier wurde die reduzierte Dotterresorption von Valproinsäure induziert, ein Endpunkt, welcher als Indikator für das embryonale Malabsorptionssyndrom gilt (Raldúa u. a., 2008). In zahlreichen Publikationen wurden jedoch allgemeine Begriffe wie "Dotter" verwendet, die Dotterödeme, Dotter Depletionen, Dotterdeformationen oder bisher nicht näher definierte Veränderungen umfassen können (Brannen u. a., 2010). Reduzierte Pigmentierung tritt in unterschiedlichem Ausmaß auf (Abbildung 13D-F): Dies betrifft entweder den gesamten Embryo (Abbildung 13D, E) oder ist auf bestimmte Organe beschränkt (Abbildung 13F). Die Pigmentierung kann über verschiedene Wege beeinflusst werden, doch die Mechanismen hierfür sind noch unbekannt. Schließlich kann es zur Deformation oder Fragmentierung des Notochords kommen, was in allen Entwicklungsstadien auftreten kann (Abbildung 13G, H). In schweren Fällen kann eine Notochord Fragmentierung mit multiplen Brüchen im Notochord beobachtet werden (Abbildung 13H). In der Literatur werden Notochord-Fehlbildungen üblicherweise als "Chorda-Malformation", "Larven mit gebogenem Rückgrat" (Beker van Woudenberg u. a., 2014) oder "Notochord-Morphologie" (Brannen u. a., 2010) beschrieben. Insgesamt sind Notochord-Fehlbildungen und -Fragmentierungen recht häufig zu beobachten (Tabelle 4). Es ist wichtig zu beachten, dass Fehlbildungen des Notochords und Wirbelsäulenverkrümmung (wie z. B. Lordose) als völlig unterschiedliche Endpunkte zu betrachten sind.

### Additional sub-lethal endpoints

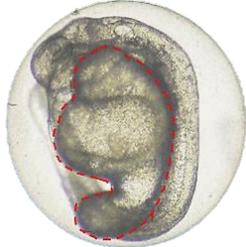
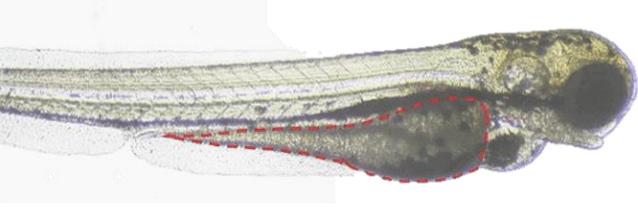
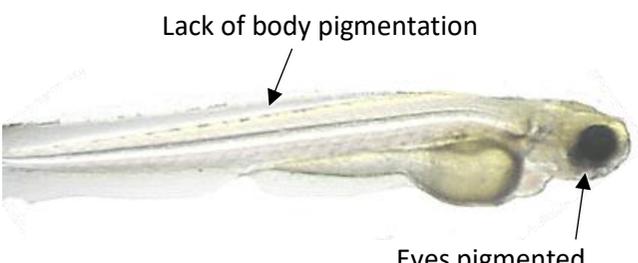
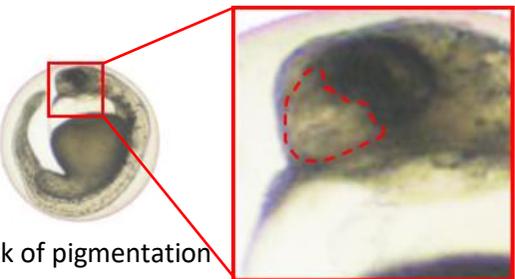
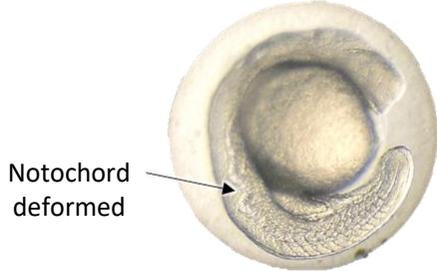
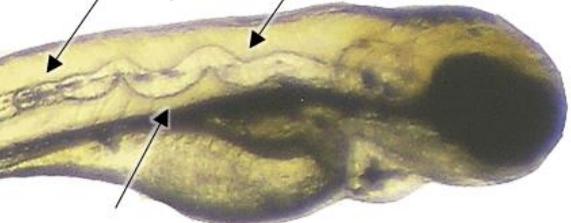
Yolk deformation & reduced resorption	<b>A</b> - 58 mg/l Valproic acid at 48 hpf 	<b>B</b> - 91 mg/l 4-Pentenoic acid at 120 hpf 	<b>C</b> - 29 mg/l Valproic acid at 120 hpf 
Impaired/missing pigmentation	<b>D</b> - 500 mg/l Paracetamol at 96 hpf  <p>Lack of body pigmentation</p> <p>Eyes pigmented</p>	<b>E</b> - 14 mg/l Valproic acid at 120 hpf  <p>No pigmentation</p>	<b>F</b> - 58 mg/l Valproic acid, 72 hpf  <p>Partial lack of pigmentation</p>
Notochord malformation	<b>G</b> - 6 µg/l Zinc pyrithione at 24 hpf  <p>Notochord deformed</p>	<b>H</b> - 13 µg/l Zinc pyrithione at 96 hpf  <p>Notochord fragmented</p> <p>Notochord deformed</p>	

Abbildung 13. Seltene subletale Endpunkte. **A:** Dotterverformung nach 48 hpf, 58 mg/l Valproinsäure. **B:** Dotterverformung nach 120 hpf, 91 mg/l 4-Pentensäure. **C:** Reduzierte Dotterresorption und -verfärbung nach 120 hpf, 29 mg/l Valproinsäure. **D:** Vollständiges Fehlen der Körperpigmentierung mit pigmentierten Augen nach 96 hpf, 500 mg/l Paracetamol. **E:** Fehlen der Pigmentierung nach 120 hpf, 14 mg/l Valproinsäure. **F:** Fehlen der Pigmentierung im Kraniofazialbereich nach 72 hpf, 58 mg/l Valproinsäure. **G:** Notochorddeformation nach 24 hpf, 6 µg/l Zinkpyrithion. **H:** Notochorddeformation und Bruch nach 96 hpf, 13 µg/l Zinkpyrithion

In Tabelle 4 sind zusätzlich Verhaltensänderungen wie Tremor und veränderte Spontanbewegungen aufgeführt. Diese Endpunkte sind ohne spezielle Hard- und Software nur schwer präzise zu dokumentieren, werden aber häufig bei subletalen Belastungskonzentrationen beobachtet. Verhaltensänderungen können auf ein neurotoxisches Potenzial der Substanz hinweisen, wie z. B. die AChE Hemmung (Schock u. a., 2012). Leider werden solche Verhaltensänderungen bei auf Morphologie basierten Teratogenitätstests oft ignoriert. Gelegentlich finden sich zusammenfassende Begriffe wie "Motilität" und "Lokomotorik" ohne weitere Erläuterung (Beker van Woudenberg u. a., 2014; Kanungo u. a., 2014). Informativere und eindeutige Begriffe, die verwendet wurden, sind z. B. "Krampfanfälligkeit", definiert als "Auftreten von für Anfallsaktivität charakteristischen Hochgeschwindigkeitsbewegungen" (Eimon und Rubinstein, 2009). Während quantitative Verhaltensanalysen Video-Tracking und ein aufwändiges Analyseprotokoll erfordern (De Esch u. a., 2012; Faimali u. a., 2017; Horzmann und Freeman, 2016; Legradi u. a., 2015; Miller u. a., 2018; Tierney, 2011), kann das generelle Vorhandensein oder Fehlen von makroskopisch beobachtbaren Verhaltensänderungen (wie z. B. Tremor oder Krampfanfälle) in einem klassischen FET-Test leicht beobachtet werden und ein erster Indikator für das neurotoxische Potenzial einer Substanz sein (Zindler u. a., 2019a).

Das vorliegende Kapitel unterstreicht die Wichtigkeit der Endpunkte, welche über die OECD TG 236 hinausgehen. Somit stellt die Beachtung aller zusätzlichen im FET-Test austretenden Endpunkte einen erheblichen Mehrwert für das Belastungsexperiment und weitere Testmethoden dar. Allerdings zeigt dieses Kapitel auch, dass die Gesamtzahl der beobachtbaren Veränderungen begrenzt ist, eine Aussage, die jedoch auch auf z. B. histopathologischen oder ultrastrukturellen Analysen zutrifft. Folglich können morphologische Beobachtungen Hinweise auf mögliche toxische Mechanismen geben, aber zusätzliche (z. B. molekulare) Studien sind letztlich erforderlich, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu erforschen. Der FET-Test würde in vielen Fällen an Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit gewinnen, wenn eine vollständige und differenziertere Beschreibung der Endpunkte vorläge und eine harmonisierte Nomenklatur verwendet werden würde. Weitere Verbesserungen könnten eine Quantifizierung der Beobachtungen beinhalten, wie z. B. ein Endpunkt-Schweregrad-Scoring. Während der FET-Test gemäß OECD TG 236 bereits ein validierter und hochinformativer Teratogenitätstest ist, könnten solche Verbesserungen, einen wichtigen Beitrag zur modernen Gefahren- und Risikobewertung leisten und gleichzeitig mit dem 3R-Prinzip vereinbar sein.

### 3.2 Die Suche nach einem „Endpunkte-Fingerprint“ im FET-Test am Beispiel von Substanzen diverser chemischer Klassen <sup>2</sup>

Das vorangegangene Kapitel zeigt, dass im FET-Test beobachtete Effekte durchaus ein Potential haben, auf spezifischere Wirkungsmechanismen von Substanzen hinzuweisen. Insbesondere mit der Anwendung molekularer Methoden in der (Öko-)Toxikologie entwickelte sich die Hypothese, dass spezifische Veränderungen und Wirkungskombinationen als "Fingerprint" der Schadstoff(klasse) dienen könnten (Gagné u. a., 2013; Neale u. a., 2017; Peterson und Bain, 2004; Yang u. a., 2009; Zhang u. a., 2015). Um dies zu untersuchen, werden in diesem Kapitel die im FET-Test getesteten DART-Substanzen im Hinblick auf spezifische akute und subletale Endpunkte analysiert. Dazu wurden die Daten nicht nur im Hinblick auf die Zuordnung zu bestimmten Substanzen, sondern auch hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs ihres Auftretens und der Intensität der Effekte beurteilt. Der Umgang mit den Tieren und die Versuchsprotokolle, sowie die Datenauswertung sind in Kapitel 2 zu finden.

13 der 18 getesteten Substanzen zeigten morphologisch beobachtbare Effekte im FET-Test, wobei die verbleibenden 5 Chemikalien bei ihrer höchsten Löslichkeit in 1% DMSO keine letalen Effekte hervorriefen (Tabelle 5). Rotenon und Hexachlorphen waren die toxischsten Substanzen mit einem EC<sub>10</sub>-Wert von 4 µg/l (± 0,3 bzw. ± 0,1 µg/l). Mit Ausnahme von Paraquat erwiesen sich auch alle Pestizide als hochtoxisch, während die Pharmazeutika bei sehr unterschiedlichen Konzentrationen Wirkungen hervorriefen. So lagen die EC<sub>10</sub>-Werte für Paracetamol und Clofibrat bei >200 mg/l (± 2,9 bzw. ± 36,7 mg/l), während Ibuprofen einen EC<sub>10</sub>-Wert von 4,7 ± 1,5 mg/l aufwies. Im Gegensatz dazu zeigte die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des Insektizids Carbaryl, zum Beispiel, eine stärkere Steigung, was bedeutet, dass die subletalen und letalen Konzentrationen näher beieinander lagen (EC<sub>10</sub>: 2,2 ± 0,26 mg/l und LC<sub>50</sub>: 12,2 ± 0,72 mg/l).

Tabelle 5. Subletale und akute Toxizität [mg/l] ausgewählter Testsubstanzen (LC- und EC-Werte bei 10% und 50% Wirkungsgrad) im Zebrabärblings-Embryo bei 96 hpf

Substanzen	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>
Acrylamid	75.5 ± 13.09	94.3 ± 7.8	154.6 ± 53.2	205.7 ± 3.1
Carbaryl	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.2	6.6 ± 1.6	12.2 ± 0.7
Clofibrat	213.3 ± 36.7	342.5 ± 53.9	602.7 ± 36.1	1113.2 ± 23.6
Colchicin	23.1 ± 3.9	32.4 ± 2.9	32.5 ± 8.4	41.4 ± 6.5

<sup>2</sup> Teile der Befunde, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, werden veröffentlicht in: von Hellfeld, et al., Specificity of morphological endpoints in the fish embryo acute toxicity (FET) test for substances with diverse modes-of-action and time-dependent observations: The search for a fingerprint. *In review*.

Substanzen	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>
Hexachlorphen [ $\mu\text{g/l}$ ]	4.0 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.1	7.0 $\pm$ 0.3	8.0 $\pm$ 0.3
Ibuprofen	4.7 $\pm$ 1.5	10.8 $\pm$ 2.9	31.7 $\pm$ 2.1	37.3 $\pm$ 3.5
Paracetamol	219.8 $\pm$ 2.9	262.6 $\pm$ 2.4	1000 $\pm$ 0.1	1167.5 $\pm$ 3.1
Paraquat *	384.7 $\pm$ 64.3	545.9 $\pm$ 7.2	721.1 $\pm$ 8.1	855.0 $\pm$ 4.8
Rotenon [ $\mu\text{g/l}$ ]	4.0 $\pm$ 0.1	7.1 $\pm$ 1.0	6.0 $\pm$ 1.2	10.0 $\pm$ 2.3
Tebuconazol	2.3 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.2	15.0 $\pm$ 0.1	17.3 $\pm$ 0.1
Tolbutamid	54.3 $\pm$ 12.3	116.9 $\pm$ 14.1	223.2 $\pm$ 6.9	278.6 $\pm$ 8.4
Triphenylphosphat	0.3 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1
Valproinsäure *	5.0 $\pm$ 0.8	7.8 $\pm$ 1.0	33.7 $\pm$ 7.8	37.4 $\pm$ 2.9

\*: Expositionsdauer von 120 hpf

### 3.2.1 Unterschiede in der Schwere und/oder Häufigkeit der im FET-Test beobachteten Endpunkte

Für eine eingehendere Bewertung der Endpunkte sind in den Tabelle 6 - Tabelle 9 alle Endpunktbeobachtungen bei  $\leq\text{EC}_{10}$ -,  $\text{EC}_{50}$ -,  $\text{LC}_{10}$ - und  $\text{LC}_{50}$ -Konzentrationen aufgeführt, wobei die Entwicklungsstadien, in denen die Endpunkte beobachtet wurden, sowie deren Schwere/Häufigkeit skizziert werden. Die "spezifischeren Endpunkte" bei  $\leq\text{EC}_{10}$ -Konzentrationen wurden nur für wenige Substanzen beobachtet, die als Kandidaten für einen Fingerabdruck der Toxizität in Betracht gezogen wurden, da diese Effekte auf das Einsetzen von substanzspezifischen Pathologien hinweisen und nur selten während des gesamten Experiments beobachtet wurden (Tabelle 6). Hier wurden 3 der 7 spezifischen Endpunkte beobachtet, alle mit sehr geringer Häufigkeit und erst spät auftretend (96 -120 hpf). In ähnlicher Weise (und erwartungsgemäß) wurden die OECD TG 236 Endpunkte nur selten und mit geringer Häufigkeit beobachtet. Wie bereits erwähnt, bildete die Colchicin-Exposition eine Ausnahme von dieser Aussage, da Koagulation in späteren Entwicklungsstadien auftrat. Die einzigen Endpunkte, die mit mäßiger Häufigkeit/Schwere induziert wurden, waren Kraniofazialdeformation und Lordose nach Hexachlorphen Exposition. Alle anderen Entwicklungsveränderungen traten mit geringer Häufigkeit auf, wobei Colchicin und Hexachlorphen die höchste Anzahl an Effekten (jeweils 11) auslösten. In Bezug auf die Entwicklungsphase wurden die meisten Endpunkte  $\leq\text{EC}_{10}$  nach  $\geq 48$  hpf aufgezeichnet.

Alle Beobachtungen, die bei  $\leq\text{EC}_{50}$ -Konzentrationen aufgezeichnet wurden, einschließlich der in Tabelle 6 aufgeführten, sind in Tabelle 7 zu finden. Von den 84 Beobachtungen wurden nur 6 als mäßig schwer/häufig (++) eingestuft. Die meisten Beobachtungen erfolgten auch hier bei  $\geq 48$  hpf, und nur 30 wurden zu mehr als einem Entwicklungszeitpunkt beobachtet. Frühe Entwicklungseffekte bei  $\leq\text{EC}_{50}$ -Konzentrationen waren Koagulation (Colchicin), fehlende Spontanbewegung (Hexachlorphen, Ibuprofen) und verzögerte Entwicklung (Hexachlorphen). Außerdem wurde eine Zunahme der induzierten Endpunkte

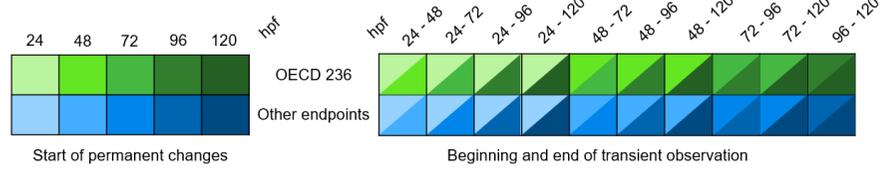
zwischen  $\leq EC_{10}$ - und  $\leq EC_{50}$  Konzentrationen festgestellt. Die Anzahl der durch Acrylamid-Belastung induzierten Effekte nahm um neun Endpunkte zu, während die Ibuprofen-Belastung weitere drei induzierte (von denen eine als spezifischer angesehen wurde), gefolgt von Paracetamol, Paraquat und Tolbutamid (+ 2). Im Gegensatz dazu wurden nur drei der sechs für Clofibrat  $\leq EC_{10}$  aufgelisteten Endpunkte auch  $\leq EC_{50}$  beobachtet, mit einer allgemeinen Verzögerung der Entwicklung als neuen Endpunkt. Für Carbaryl, Clofibrat, Hexachlorphen und Triphenylphosphat wurden keine Veränderungen in Bezug auf die induzierten Endpunkte festgestellt. Die  $EC_{10}$  (Tabelle 6) und  $EC_{50}$ -Werte (Tabelle 7) wurden wegen fehlender Beobachtungen für Rotenon extrapoliert.

Alle Beobachtungen, die bei  $\leq LC_{10}$ -Konzentrationen aufgezeichnet wurden, sind in Tabelle 8. Vergleicht man sie mit Tabelle 6 und Tabelle 7, so hat sich die Anzahl der Beobachtungen und die Entwicklungszeitspanne ihres Auftretens deutlich erhöht. Mit Ausnahme der Spontanbewegung, die aufgrund der Entwicklung des Lokomotor-Verhaltens im Zebrafisch-Embryo auf 24 hpf beschränkt ist, erwiesen sich die meisten Endpunkte über längere Zeiträume der Entwicklung als positiv (d. h., sie blieben erhalten). Dies zeigt, dass sich mit zunehmender Expositionskonzentration vielfältigere Endpunkte akkumulieren, wodurch diese Endpunkte weniger spezifisch für die Substanz sind und eher einen Hinweis auf die allgemeine Toxizität geben. Allerdings stieg auch die Anzahl der beobachteten spezifischeren Endpunkte (die mit  $\geq 4$  der getesteten Substanzen beobachtet wurden), die im FET-Test ermittelt wurden. Kopftremor ist ein solches Beispiel, das nur nach Exposition mit Ibuprofen bei  $\leq EC_{50}$  sowie Tebuconazol bei  $\leq LC_{10}$  beobachtet werden konnte. Dieser Endpunkt wurde als Indikator für eine reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit angesehen und in der Literatur als "nach Luft schnappen" beschrieben (Huang u. a., 2014). Die für  $\leq LC_{10}$ -Konzentrationen in Tabelle 8 beobachteten und diskutierten Trends finden ihre Fortsetzung bei  $\leq LC_{50}$ -Konzentrationen (Tabelle 9). Die Mehrzahl der induzierten Endpunkte ist hier unspezifischer Natur, wie z. B. Ödeme, Durchblutungsstörungen und allgemeine Entwicklung. Darüber hinaus induzierte keine der getesteten Chemikalien weniger als 8 Entwicklungsveränderungen, wobei z.B. Hexachlorphen im erweiterten FET-Test 18 verschiedene morphologische Effekte induzierte.

Tabelle 6. Semi-quantitative Auswertung aller bei  $\leq EC_{10}$ -Konzentrationen beobachteten Effekte in Zebrabärblings-Embryonen, gruppiert in letale Wirkungen gemäß OECD TG 236 (OECD 2013), unspezifische Veränderungen, die bei den meisten Substanzen beobachtet wurden, sowie spezifischere Endpunkte, die bei <4 Substanzen beobachtet wurden. Substanzen alphabetisch geordnet (Beobachtungen aus n=2 unabhängigen Replikaten)

44

Compound	EC <sub>10</sub> 96h (mg/l)	OECD 236 endpoints				Unspecific endpoints												More specific endpoints											
		Coagulation	Lack of Somite formation	Tail attached	Missing heart beat	No spontaneous movement	Delayed development	Impaired heart rate	Missing blood flow	Impaired blood flow	Blood pooling	Pericardial oedema	Yolk oedema	Impaired pigmentation	Craniofacial deformation	Fin underdevelopment	Lordosis	Reduced yolk resorption	Yolk deformation	Trenor	Not hatched	Increased eye size	Head trenor	Otolith deformation	Scoliosis	Kyphosis	Impaired tailfin	Pectoral fins not moving	
Acrylamide	75.4																				+								
Carbaryl	2.2						+					+						+											
Clofibrate	200							+			+							+											
Colchicine	23.1	+			+			+	+	+	+	+															+		
Hexachlorophene	0.004					++	+	+			+	+	+	+	+	++										+			
Ibuprofen	4.7							+			+	+	+								+								+
Paracetamol	200											+																	
Paraquat *	400									+	+	+	+								+								
Rotenone	0.004																												
Tebuconazole	2.3																					+							
Tolbutamide	54.3									+			+																+
Triphenylphosphate	0.3																					+							
VPA *	5.1				+			+	+	+	+	+	+	+												+			



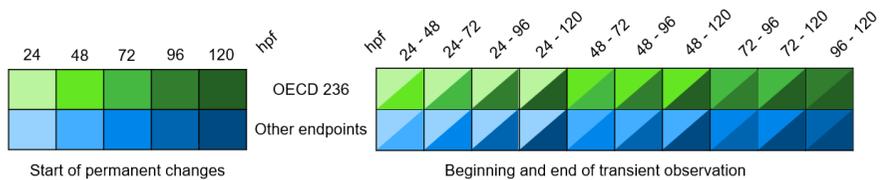
Intensität der Wirkung: +: selten vorhanden und/oder nicht schwerwiegend; ++: häufig vorhanden und/oder mäßig schwerwiegend; +++: stark vorhanden und/oder sehr schwerwiegend.

Farbcode: Einfarbige Signaturen zeigen Effekte an, die ab dem angegebenen Zeitpunkt bis zum Ende des Experiments auftreten. Gestreifte Signaturen zeigen Effekte an, die nur zwischen den beiden durch die Farben gekennzeichneten Zeitpunkten beobachtet wurde.

Tabelle 7. Semi-quantitative Auswertung aller bei  $\leq EC_{50}$ -Konzentrationen beobachteten Effekte in Zebraabblings-Embryonen, gruppiert in letale Wirkungen gemäß OECD TG 236 (OECD 2013), unspezifische Veränderungen, die bei den meisten Substanzen beobachtet wurden, sowie spezifischere Endpunkte, die bei  $<4$  Substanzen beobachtet wurden. Substanzen alphabetisch geordnet (Beobachtungen aus n=2 unabhängigen Replikaten)

Compound	EC <sub>50</sub> 96h (mg/l)	OECD 236 endpoints				Unspecific endpoints														More specific endpoints									
		Coagulation	Lack of Somite formation	Tail attached	Missing heart beat	No spontaneous movement	Delayed development	Impaired heart rate	Missing blood flow	Impaired blood flow	Blood pooling	Pericardial oedema	Yolk oedema	Impaired pigmentation	Craniofacial deformation	Fin underdevelopment	Lordosis	Reduced yolk resorption	Yolk deformation	Tremor	Not hatched	Increased eye size	Head tremor	Otolith deformation	Scoliosis	Kyphosis	Impaired tailfin	Pectoral fins not moving	
Acrylamide	94.0				+	+	+	+	+	+	+			+		++					+								
Carbaryl	2.4						+				+							+											
Clofibrate	300							+	+	+	+	+		+++			+												
Colchicine	32.4	+			+		+	+	+	+	+	+					+										+		
Hexachlorophene	0.005					++	+	+		+	+	+	+	+	++		++									+			
Ibuprofen	10.8					+		+		+	+	+					+				+						+		
Paracetamol	300												+	++	+														
Paraquat *	500								+	+	+	+		+			+	+		+									
Rotenone	0.007																												
Tebuconazole	5.3						+							+													+		
Tolbutamide	116.9							+	+	+	+			+													+		
Triphenylphosphate	0.5																										+		
VPA *	7.8				+			+	+	+	+	+	+	+			++		+						+				

45



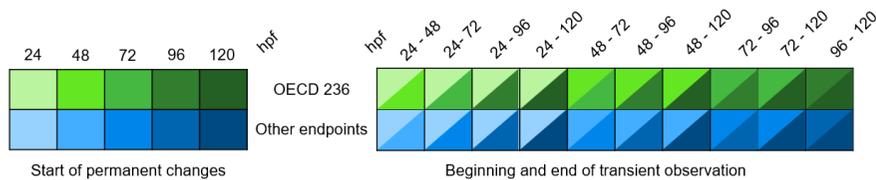
Intensität der Wirkung: +: selten vorhanden und/oder nicht schwerwiegend; ++: häufig vorhanden und/oder mäßig schwerwiegend; +++: stark vorhanden und/oder sehr schwerwiegend.

Farbcodierung: Einfarbige Signaturen zeigen Effekte an, die ab dem angegebenen Zeitpunkt bis zum Ende des Experiments auftreten. Gestreifte Signaturen zeigen Effekte an, die nur zwischen den beiden durch die Farben gekennzeichneten Zeitpunkten beobachtet wurde.

Tabelle 8. Semi-quantitative Auswertung aller bei  $\leq LC_{10}$ -Konzentrationen beobachteten Effekte in Zebraabblings-Embryonen, gruppiert in letale Wirkungen gemäß OECD TG 236 (OECD 2013), unspezifische Veränderungen, die bei den meisten Substanzen beobachtet wurden, sowie spezifischere Endpunkte, die bei <4 Substanzen beobachtet wurden. Substanzen alphabetisch geordnet (Beobachtungen aus n=2 unabhängigen Replikaten)

Compound	LC <sub>10</sub> 96h (mg/l)	OECD 236 endpoints				Unspecific endpoints														More specific endpoints								
		Coagulation	Lack of Somite formation	Tail attached	Missing heart beat	No spontaneous movement	Delayed development	Impaired heart rate	Missing blood flow	Impaired blood flow	Blood pooling	Pericardial oedema	Yolk oedema	Impaired pigmentation	Craniofacial deformation	Fin underdevelopment	Lordosis	Reduced yolk resorption	Yolk deformation	Tremor	Not hatched	Increased eye size	Head tremor	Otolith deformation	Scoliosis	Kyphosis	Impaired tailfin	Pectoral fins not moving
Acrylamide	166.6				+	+	++	+	+	+	+	+		+		++					+							
Carbaryl	6.6	+				+	+	+	+	++	+	+				++	++			++	+							
Clofibrate	600	+			+	+	+	+	+	+	+		++	+++	+	+												
Colchicine	32.5	+			+		+	+	+	+	+	+		+		+										+		
Hexachlorophene	0.007					++	+	+	+	+	+	+	+	+		++									+			
Ibuprofen	31.7					++	+	+	+	++	+	++		+		++				++	+				+			
Paracetamol	1000				+	+	++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	++	++				++	++	+++						
Paraquat *	700							+	+	+	+			+		+	+			+								
Rotenone	0.006							+			+	+	+	+							+							
Tebuconazole	15.0						+	+		+		+		+		+					++				+			
Tolbutamide	223.2						+		+	+	+	+		+++	+	++	++			+	++							
Triphenylphosphate	1.4					++	+	+	+	+	+	+					+			++								
VPA *	22.8				+		+	+	++	+	++	+++	+	++		+	+++			+++				+	+			

46



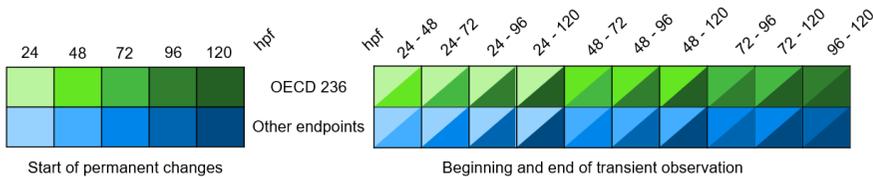
Intensität der Wirkung: +: selten vorhanden und/oder nicht schwerwiegend; ++: häufig vorhanden und/oder mäßig schwerwiegend; +++: stark vorhanden und/oder sehr schwerwiegend.

Farbcode: Einfarbige Signaturen zeigen Effekte an, die ab dem angegebenen Zeitpunkt bis zum Ende des Experiments auftreten. Gestreifte Signaturen zeigen Effekte an, die nur zwischen den beiden durch die Farben gekennzeichneten Zeitpunkten beobachtet wurde.

Tabelle 9. Semi-quantitative Auswertung aller bei  $\leq LC_{50}$ -Konzentrationen beobachteten Effekte in Zebraabblings-Embryonen, gruppiert in letale Wirkungen gemäß OECD TG 236 (OECD 2013), unspezifische Veränderungen, die bei den meisten Substanzen beobachtet wurden, sowie spezifischere Endpunkte, die bei <4 Substanzen beobachtet wurden. Substanzen alphabetisch geordnet (Beobachtungen aus n=2 unabhängigen Replikaten)

Compound	LC <sub>50</sub> 96h (mg/l)	OECD 236 endpoints				Unspecific endpoints														More specific endpoints								
		Coagulation	Lack of Somite formation	Tail attached (lethal)	Missing heart beat	No spontaneous movement	Delayed development	Impaired heart beat	Missing blood flow	Impaired blood flow	Blood pooling	Pericardial oedema	Yolk oedema	Impaired pigmentation	Craniofacial deformation	Fin underdevelopment	Lordosis	Reduced yolk resorption	Yolk deformation	Tremor	Not hatched	Increased eye size	Head tremor	Otolith deformation	Scoliosis	Kyphosis	Impaired tailfin	Pectoral fins not moving
Acrylamide	199.3				++	+	++	+	+++	++	++	+		+		++				+	+							
Carbaryl	12.2	+				+	++	++	+	++	+	+				+++	+++			+++	+							
Clofibrate	1100	+			++	++	+	++	++	++	++		+	++	+	++		+		+	+							
Colchicine	41.4	++			++		++	++	+	++	+	+		+		++										+++		
Hexachlorophene	0.008	+	+			++	+	+	++	+	+	+	++	++	+	+				+	++		+		+			
Ibuprofen	37.3					++	+	+	++	+	++	+		+		++				++	+		+					
Paracetamol	1200				+	+	++	+++	++	+		++	+++	+++	++	++				++	++	+++						
Paraquat *	900				+				+	+	++			+		++	++			+								
Rotenone	0.01	++	++	+							++	+	+													+		
Tebuconazole	17.3				+		+		+			+		+		+						+++		++				
Tolbutamide	278.6						+		+	+	+	+		+++	+	++	++	+	+	+	+	++						
Triphenylphosphate	1.6	+	+	++	++	+	+++	+++	+++		+++	+++				+	++				+++							
VPA *	37.4				+		+	++	+	+	+	+	+++	+++		++	+++			+++	+		+	++		++	++	

47



Intensität der Wirkung: +: selten vorhanden und/oder nicht schwerwiegend; ++: häufig vorhanden und/oder mäßig schwerwiegend; +++: stark vorhanden und/oder sehr schwerwiegend.

Farbcode: Einfarbige Signaturen zeigen Effekte an, die ab dem angegebenen Zeitpunkt bis zum Ende des Experiments auftreten. Gestreifte Signaturen zeigen Effekte an, die nur zwischen den beiden durch die Farben gekennzeichneten Zeitpunkten beobachtet wurden.

### 3.2.3 Die zeitabhängige Toxizität von Acrylamid und Colchicin

Eine statistisch signifikante Veränderung der LC-Werte über die Dauer des FET-Tests konnte nur für Acrylamid und Colchicin gemessen werden (Abbildung 14). Die LC<sub>50</sub> Konzentration von Acrylamid nahm zwischen 48 und 96 hpf signifikant mit signifikanten Unterschieden zwischen jedem der drei Zeitpunkte ( $p=0,034$ ). Bei den mit Colchicin-exponierten Individuen variierte der LC<sub>50</sub>-Wert signifikant zwischen 48 und 96 hpf ( $p=0,019$ ), wobei die Signifikanz auf die Werte beschränkt war, die bei 48 und 96 hpf erreicht wurden. Im Gegensatz dazu zeigten die LC<sub>10</sub>-Werte für beide Substanzen keine signifikante Zeitabhängigkeit, obwohl für Colchicin ein klarer Trend zu erkennen ist.

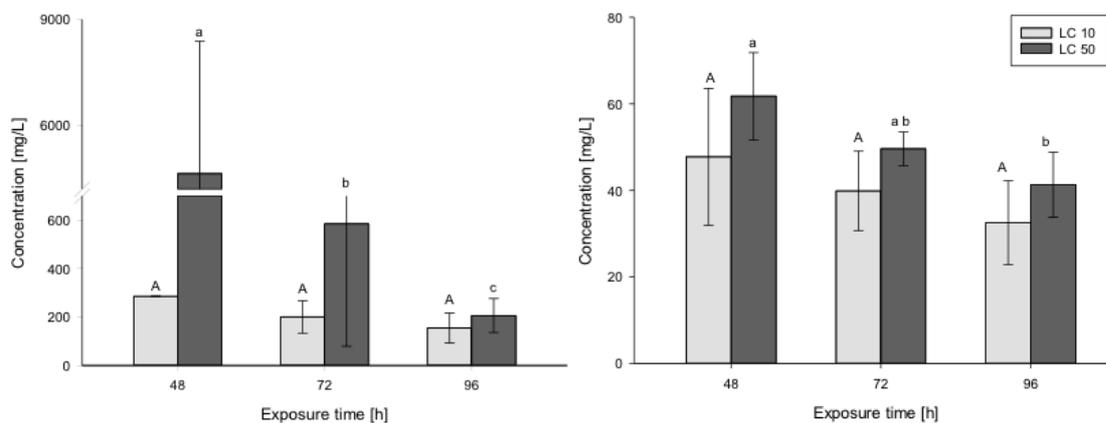


Abbildung 14. Zeitabhängige Toxizität von Acrylamid (links) und Colchicin (rechts) in Zebraäbrblings-Embryonen bis 96 hpf gemäß OECD TG 236 (n=4). Kleinbuchstaben: statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten (a:  $p=0,034$ ; b:  $p=0,019$ ); Gleiche Großbuchstaben: kein statistisch signifikanter Unterschied

Der FET-Test wird in einer Phase rapider Entwicklung durchgeführt (Kimmel u. a., 1995) weshalb Chemikalien auf zugrunde liegende Mechanismen oder Organe einwirken können, bevor diese vollständig entwickelt sind, was nicht nur ihre Funktion, sondern auch morphologische Aspekte beeinträchtigt. Hepatotoxische Substanzen können z.B. bereits die Entwicklung der Leber behindern oder die gebildete und funktionsfähige Leber ab 72 hpf beeinflussen. Das volle toxische Potenzial auf den Embryo kann sich jedoch erst ab 120 hpf entfalten, wenn die Leber ihre volle Funktionalität und Volumen erreicht hat (de Esch et al. 2012). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum die Toxizität von z.B. Valproinsäure über die gesamte Expositionsdauer ansteigt (Dai u. a., 2015). Bei der Beurteilung der Zeitabhängigkeit morphologischer Effekte sollte auch die potentielle Barrierefunktion des Chorions und die begrenzte Absorptionsrate bestimmter Substanzen berücksichtigt werden (Brox u. a., 2016), wobei das volle toxische Potenzial erst beim Schlüpfen zum Tragen kommt (Henn und Braunbeck, 2011; Roche u. a., 1994). Das Zentralnervensystem ist ein weiteres Organ, das mit Blick auf seine Entwicklungszeit betrachtet werden muss. Es ist erst nach 10 dpf voll entwickelt (de Esch et al. 2012), was bedeutet, dass, während die im FET-Test getesteten Substanzen wahrscheinlich schwere neuroentwicklungsbedingte Effekte induzieren, einige, aber nicht alle Endpunkte in 96 hpf alten Embryos beobachtet werden können (Zindler et al., 2020a, b, 2019a, b).

### 3.2.4 Beispiele für einen „Endpunkte-Fingerprint“ im FET-Test

Um die Hypothese zu prüfen, dass bestimmte Endpunkte möglicherweise substanzspezifisch sind, sollten sie im Hinblick auf die Funktionsweise und die Wirkmechanismen der Substanz bewertet werden. **Acrylamid**-exponierte Zebrafisch-Embryonen wiesen bei  $\leq EC_{10}$ -Konzentrationen einen verminderten Schlupferfolg sowie verschiedene Blutkreislaufeffekte und eine verzögerte Entwicklung auf. Es wurde festgestellt, dass Acrylamid die Anzahl und Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten reduziert, was zu morphologischen Veränderungen des Herzens führt (Huang u. a., 2018), die sich wiederum auf den allgemeinen Blutkreislauf und die Gesamtentwicklung auswirken. Reduzierte Herzfrequenzen *per se* deuten nicht unbedingt auf eine spezifische Pathologie hin, aber wenn man sie in Korrelation mit Endpunkten wie reduzierter Herzgröße oder fehlender Herzschleife betrachtet, können sie auf eine reduzierte proliferative Kapazität des Herzens hinweisen (Huang u. a., 2018; Isales u. a., 2015; Schock u. a., 2012). Ein weiteres Beispiel ist **Carbaryl** mit Endpunkten bei EC-Konzentrationen wie verzögerter Entwicklung, Perikardödeme und verminderte Dotterresorption. Studien zeigten, dass Carbaryl kompetitiv an Melatonin Rezeptoren bindet (Popovska-Gorevski u. a., 2017), was sich negativ auf den Gesamtstoffwechsel und die zirkadiane Uhr auswirkt. Es wurde angenommen, dass die reduzierte Dotterresorption durch das Expressionsniveau von Peroxisom-Proliferation-aktivierten Rezeptoren (PPAR) $\alpha$  und Veränderungen im Lipidstoffwechsel verursacht wird (Coimbra u. a., 2015; Kamstra u. a., 2015; Weston u. a., 2009). Die Leber des Zebrafisch-Embryos ist nach 72 hpf vollständig ausgebildet (de Esch et al. 2012), was bedeutet, dass Dottersack-bezogene Endpunkte als Indikatoren für das Hepatotoxizitätspotenzial einer Substanz angesehen werden können. Hier wird die Beobachtung sowohl einer reduzierten Dottersackresorption als auch einer verzögerten Entwicklung als Indikator für die Wirkung des Wirkstoffs auf Melatonin Rezeptoren angesehen.

Während die Entstehung von Perikardödemen nicht vollständig bekannt ist, erwiesen sich Ödeme bei **Hexachlorphen**-exponierten Mäusen als kurzfristige Effekte und verschwanden nach Einstellen der Behandlung (Powell u. a., 1973). In Anbetracht der Häufigkeit des Auftretens von Ödemen bei der EC-Konzentration in den vorliegenden Befunden, sind diese leicht auslösbar und scheinen somit auf einen allgemeinen Stresszustand hinzuweisen. Bei  $\leq EC_{10}$  Konzentrationen induzierte Hexachlorphen eine Kyphose bei den Zebrafisch-Embryonen, zusammen mit verschiedenen unspezifischen Endpunkten. In der Literatur heißt es, dass Kyphose aufgrund von Myozyten-Degeneration und Nervenzell-Apoptose auftreten kann (Kim u. a., 2009). Es wurde bewiesen, dass Hexachlorphen durch seine Wirkung als Membrankanal-Inhibitor (Zheng u. a., 2012) einen starken Einfluss auf Apoptose hat (Kondratskyi u. a., 2015). Dies unterstützt die Hypothese, dass Kyphose ein spezifischerer Endpunkt ist, der mit spezifischen Stressoren und zugrundeliegenden Signalwegen verbunden ist. **Colchicin** beeinflusst die Zellteilung generell, was die beobachtete fehlerhafte Zellbildung in Verbindung mit Lordose und schließlich Koagulation des Embryos (auch zu Zeitpunkten nach 24 hpf) sowie die gestörte Schwanzflossenentwicklung leicht erklären kann. Darüber hinaus wird angenommen, dass Veränderungen in der

Expression des Fibroblasten-Wachstumsfaktors, des Sonic Hedgehog und des Bone Morphogenetic Proteins sowie der *Wnt*- und *Notch*-Gene ebenfalls eine Lordose induzieren (Lin, 2002). Das frühe Auftreten von Lordose und das späte Auftreten von Koagulation könnte daher in der vorliegenden Studie spezifisch für Colchicin sein und auf eine Kombination früher Entwicklungswege zurückzuführen sein.

Sowohl **Ibuprofen** als auch **Tebuconazol** induzierten die Endpunkte des Kopftremors, der zuvor mit einem "nach Luft schnappenden" Verhalten bei reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit in Verbindung gebracht wurde (Huang u. a., 2014). Ibuprofen, ein PPAR $\alpha$ -Modulator und Cyclooxygenase (COX)-Inhibitor (David und Pancharatna, 2009a; Puhl u. a., 2015), induzierte den Kopftremor bei  $\leq EC_{50}$  Konzentrationen, während das oxidativen Stress induzierende Tebuconazol (ebenfalls bekannt dafür, das endokrine System zu stören und Zytochrom P450; CYP450 zu hemmen) dies erst bei LC $_{10}$ -Konzentrationen tat (Sancho u. a., 2010; J. Di Yang u. a., 2018). Oxidativer Stress wurde sowohl als Ursache als auch als Folge der reduzierten Sauerstoffverfügbarkeit bei Fischen identifiziert, was zu den verstärkten Kiemenbewegungen oder dem Kopftremor/"nach Luft schnappen" führt. Es ist bekannt, dass nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente (NSAIDs, aus dem Englischen; non-steroidal anti-inflammatory drugs), wie Ibuprofen, die Herzfrequenz bei Fischen erhöhen (Zhang u. a., 2020). Das führt zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf, damit dieses Verhalten aufrechterhalten werden kann. Obwohl der Endpunkt Kopftremor keine häufige Beobachtung ist, könnten ihm unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

Im vorliegenden Kapitel wurde zwischen Endpunkten unterschieden, die auf allgemeine oder spezifischere Pathologien hinweisen. In jedem Fall liefert die Analyse der Endpunkte deutliche Hinweise darauf, dass der FET-Test deutlich detailliertere Informationen über die Testsubstanzen liefern kann als ursprünglich in der OECD-Richtlinie 236 vorgesehen. Durch das Einführen einer umfangreichen Endpunktliste neben denen der ursprünglichen OECD-Richtlinie konnten hier Endpunktprofile entwickelt werden, auch wenn der endgültige Effekt der verschiedenen Toxizitäten der gleiche sein könnte. Obwohl es sich um einen rudimentären "Endpunkte-Fingerprint" handelt, kann das daraus entstehende Bild für regulatorische Zwecke im Hinblick auf die Definition umweltrelevanter Schwellenwerte von Interesse sein. Aufgrund der zahlreichen Vorteile des Zebrafisches als Testorganismus und angesichts seiner Vielseitigkeit, Reproduzierbarkeit und Komplementarität mit anderen Systemen hat der FET-Test über viele Jahre hinweg zunehmende Aufmerksamkeit erhalten. Zukünftige Forschung würde jedoch sehr von der Schaffung einer FET-Datenbank profitieren, die den Vergleich von Effekten und die Verwendung eines einheitlichen Scoring-Systems ermöglicht. Eine etablierte, umfassende Nomenklatur für verschiedene Endpunkte würde Ergebnisse zusätzlich vergleichbarer machen.

### 3.3 Der Vergleich des FET-Tests mit *In vitro*-Testsystemen in Bezug auf Substanzen diverser chemischer Klassen

Da die vorangegangenen Kapitel sich mit der Zulässigkeit des FET-Tests in der generellen Teratogenitätsforschung anhand der DART (developmental and reproductive toxicity) Substanzen befasst hat, muss nun der größere wissenschaftliche Kontext mit in Betracht gezogen werden. Hierzu wurden die bereits vorgestellten Substanzen, im Zuge des EU-ToxRisk Projektes aus in anderen *In vitro*-Testsystemen getestet. Zur Bestimmung der Neurotoxizität werden die NCC-Migrationsfunktionalität (cMINC-Assay; Chambers u. a., 2009; Morrison u. a., 2015; Nyffeler u. a., 2017a; Shi u. a., 2012; Zhou u. a., 2016) und Neuronen Auswuchs-Funktionalität (NeuriTox-Test; Bal-Price u. a., 2018; Krug u. a., 2013; Lotharius, 2005; Scholz u. a., 2011; Stiegler u. a., 2011) ausgewählt. Die Nierentoxizität wurde mit *In vitro*-Assays verglichen, die die Zellviabilität der proximalen Tubulus Zellen der Niere (RPT-EC/TERT1-Assay; Aschauer u. a., 2015; Limonciel u. a., 2011; Wieser u. a., 2008) und die Lebensfähigkeit der fötalen Nierenzellen (HEK 293-Assay; Shaw u. a., 2002) gemessen. Hepatotoxizität wurde durch wie die Zellviabilität von induzierten Hepatozyt-Stammzellen (iPSC hep Assay; Roelandt u. a., 2013, 2012) und von Hepatozyten (HepG2 Assay; Aden u. a., 1979; Darlington u. a., 1987) gemessen. Um die Sensitivität des FET-Tests auf Reproduktionstoxizität zu bestimmen, wurden die Daten mit der Testbatterie des CALUX®-Assays (van der Burg u. a., 2015) verglichen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass für Substanzen, die organspezifische Toxizität ausdrücken, der FET-Test weniger empfindlich sein würde als die entsprechenden *In vitro*-Assays. Es wurde weiterhin vermutet, dass Substanzen mit multiplen Wirkungsweisen oder komplexen Effekten im FET-Test bei niedrigeren Konzentrationen als in den *In vitro*-Assays als schädlich bestimmt würden.

Die FET-Test Ergebnisse der hier verwendeten Substanzen wurden bereits in den vorhergehenden Kapiteln ausgewertet. Bei den unten genannten *In vitro*-Tests wurden unterschiedliche Expositionskonzentrationen verwendet, wobei die endgültige DMSO-Konzentration in keinem Fall 0,1% überstieg. Ein detaillierter Einblick in alle Testmethoden des EU-ToxRisk DART-Projekts wurde von Krebs et al., (2020) veröffentlicht.

#### 3.3.1 Die *In vitro*-Methoden <sup>3</sup>

**CALUX®-Assay.** Die folgenden Reportergeren-Assays wurden bei DART-Tests verwendet: Östrogen (ER $\alpha$ )-(Ant-)Agonist, Androgen (AR)-Antagonist, Progesteron (PR)-(Ant-)Agonist, Glukokortikoid (GR)-Antagonist, Schilddrüsenrezeptor (TR $\beta$ )-Antagonist, Pregnan X-Rezeptor (PXR)-Agonist, PPAR  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Agonisten, Arylkohlenwasserstoffrezeptor

---

<sup>3</sup> Die hier beschriebenen Methoden, und die daraus resultierenden Ergebnisse wurden von Kooperationspartnern im Auftrag des EU-ToxRisk Projekts ausgeführt. Die darauffolgende Datenanalyse wurde von mir ausgeführt und hat das Ziel, den Zebrafärbings-Embryo in den Kontext anderer Methoden zu setzen.

(AhR)-Agonist, Wnt-Signalweg (TCF), Aktivatorprotein-1-Signalweg (AP1), Endoplasmatischer Retikulum-Stress-Signalweg (ESRE), Oxidativer-Stress-Reaktionsweg nrf-2 (Nrf2), Transkriptionsaktivierung der Promotorregion des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21 (p21) und Transkriptionsaktivierung durch das Protein p53 (p53).

**cMINC.** Differenzierte NCCs (Zimmer u. a., 2012) wurden um einen Silikon Stopper ausgesetzt (Nyffeler u. a., 2017b, 2017a). Der Stopper wurde nach 24 Stunden entfernt, mit Beginn der Exposition. Zellmigration wurde nach 24 Stunden mittels Highcontrast-Imaging als Endpunkt der Funktionalität gemessen. Das Standard operating procedure (SOP) ist auf der Datenbank des Europäischen Zentrums für die Validierung von Prüfmethode über Alternativmethoden zu Tierversuchen (ECVAM DB-ALM) unter der Protokollnummer 195 verfügbar.

**NeuriTox.** Zwei Tage differenzierte neuronale LUHMES Vorläuferzellen wurden 24 Stunden lang den Testsubstanzen ausgesetzt. Nach 3 Tagen wurden die Zell Viabilität und das Neuritenwachstum mittels Highcontrast-Imaging als Endpunkt für die Funktionalität gemessen (Delp u. a., 2019, 2018; Krug u. a., 2013). Das SOP ist unter ECVAM DB-ALM Nr. 200 verfügbar.

**RPTEC/TERT1.** 7-Tage differenzierte immortalisierte proximale Nierentubulus Zellen (Wieser u. a., 2008), wurden den Testsubstanzen ausgesetzt und in Monolayer für 24 Stunden untersucht. Als Funktionalitätspunkt wurden das Resazurin-Reduktionsvermögen, die Calcein-SM-Aufnahme und die Quantifizierung der Laktatproduktion untersucht (Limonciel u. a., 2011).

**HEK 293.** Entdifferenzierte fötale Nierenzellen wurden in epitheloiden Monolayern gezüchtet und der Substanz für 24 Stunden ausgesetzt. Das Resazurin-Reduktionsvermögen und die Laktatdehydrogenase-Freisetzung wurden als Viabilitäts-Endpunkt gemessen. Das SOP ist unter ECVAM DB-ALM Nr. 201 verfügbar.

**iPSC hep.** iPSC-Zellen wurden 30 Tage lang zu Hepatozyten differenziert (Vanhove u. a., 2016) und für 24 Stunden den Testsubstanzen ausgesetzt. Die Resazurin-Reduktion wurde als Zytotoxizitätsindikator der Viabilität gemessen.

**HepG2.** HepG2-Zellen wurden 48 Stunden lang den Testsubstanzen ausgesetzt und die Resazurin-Reduktion wurde als Zytotoxizitätsindikator gemessen.

Weitere Informationen zur Auswertung der Rohdaten für die aufgeführten Methoden finden Sie in Krebs et al., (2020). Die Rohdaten wurden verwendet, um die Benchmark-Konzentrationen (BMC) mit "BMCEasy" (<http://invitrotox.uni-konstanz.de/>) zu berechnen.

Diese basieren auf der Bewertung der Daten im Vergleich zu einer vorher festgelegten Benchmark-Reaktion (BMR), wie z. B. eine prozentual reduzierte Zell Viabilität (Krebs et al., 2020). Der  $BMC_{10}$ -Wert gibt die Konzentration an, bei der die modellierte Kurve die BMR bei 10% Reaktion übersteigt und kann als *In vitro*-Testsystem-Äquivalent des  $EC_{10}$  betrachtet werden. Diese Werte [Mol] wurden zur Vergleichbarkeit zwischen den Assays log-transformiert ( $\log_{10}$ ) und die Daten als  $\log[M]$  angegeben. Je höher der Wert ist, desto toxischer ist die Substanz in dem jeweiligen Assay.

### 3.3.2 Die subletale Toxizität der Substanzen in allen Testsystemen

Die  $BMC_{10}$ -Werte der Testsysteme sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zu finden, wobei "nt" auf Substanzen hinweist, die nicht getestet wurden und "ne" darauf, dass kein Wert ermittelt wurde. Chemikalien mit einem  $\log[M]$  von  $<4,1$  werden als gering/leicht toxisch eingestuft, eine moderate Toxizität besteht zwischen  $4,1$  und  $6,1$ , gefolgt von einer hohen Toxizität ( $<6,1$  bis  $>7,1$ ), und Substanzen mit Werten  $>7,1$  werden als stark toxisch eingestuft. Acrylamid, Paracetamol, Sulfisoxazol und Tolbutamid Exposition führte in keinem der Assays zu mehr als leichter Toxizität. Während Carbaryl und Valproinsäure zu Veränderungen in einer hohen Anzahl von Reportergenlinien im CALUX®-Assay führten, war keiner der Effekte von hohem Schweregrad. In allen Assays waren die einzigen Substanzen, welche eine (sehr) starke Toxizität induzierten, Colchicin, Hexachlorphen,  $MPP^+$ , PCB 180, Rifampicin, Rotenon und Taxol, wobei Rotenon als einziges in jedem Assay starke bis sehr starke Reaktionen hervorrief. Im FET-Test zeigten die DART-negativen Substanzen wenig bis keine Wirkung, ebenso wie Acrylamid, Paracetamol und Paraquat.  $MPP^+$ , PCB 180, Rifampicin, Sulfisoxazol und Taxol (welche aufgrund der bereits angesprochenen Löslichkeitsgrenze keine Wirkungen hervorriefen). Mäßige Toxizität wurde nach Exposition mit Carbaryl, Colchicin, Triphenylphosphat, Tebuconazol und Valproinsäure festgestellt. Nur Hexachlorphen und Rotenon, zwei Pestizide, wiesen eine hohe Toxizität auf. Die in Abbildung 15 dargestellten radialen Balkendiagramme zeigen, dass der FET-Test für jede getestete Substanzen (mit Ausnahme derjenigen mit Löslichkeitsbeschränkungen) erfolgreich Toxizitätswerte ermittelt hat. Chemikalien, von denen angenommen wird, dass sie das hepatische (rot kodiert im radialen Balkendiagramm), das renale (orange kodiert) und das neuronale System (grün kodiert) beeinträchtigen, befanden sich sowohl in der Gruppe der hochgradig störenden (z. B. Rotenon) als auch der kaum toxischen Substanzen (z. B. Clofibrat). Von keiner der hoch subletalen toxischen Substanzen wird jedoch angenommen, dass sie nur ein Zielorgan betrifft.

Tabelle 10. BMC<sub>10</sub> [-Log[M]] aller Substanzen der verschiedenen Testsysteme des EU-ToxRisk Projektes



Substanzen	CALUX ® Assay Testbatterie																									
	Tox <sup>a</sup>		Nucleärer Hormonreceptor <sup>a</sup>					(Lipid) Stoffwechsel <sup>b</sup>					Stress <sup>b</sup>			Stress <sup>c</sup>			Neuro		Renal		Hepatisch		FET	
	Cyto	ERα	AR-anti	PR-anti	GR-anti	TRb	p21	PRX	PPARα	PPARδ	PPARγ	Ahr	AP1	ESRE	P21	Nrf2	TCF	p53	p53 S9	cMINC	Neuri-Tox	RPTEC	HEK 293	iPSC		HepG2
Clofibrat	ne	4.5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	5.3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	3.5	ne	3.5	5.5		ne
Ibuprofen	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	4.5	4.0	4.0	ne	ne	ne	ne	ne	ne	3.0	ne	ne	3.2	ne	3.5	3.7	2.9	1.6
Sulfisoxazol	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	3.5	ne	3.4	ne	4.0	ne
Tolbutamid	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	4.0	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	3.8	ne	3.7	1.2	ne	3.5
Acrylamid	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	3.3	3.3	3.0	2.3	3.4	3.1	3.0
Carbaryl	ne	4.7	5.6	4.8	ne	ne	ne	4.0	ne	ne	ne	ne	4.8	4.0	ne	4.2	ne	3.8	ne	ne	5.0	ne	ne	2.5	4.5	5.0
HgCl <sub>2</sub>	4.7	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	5.8	ne	ne	5.5	ne	5.7	6.0	5.3	5.8	nt	5.1	5.1	4.7	nt
PCB 180	ne	ne	6.1	6.3	ne	ne	ne	5.5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	5.4	4.8	nt	3.4	nt	4.3	ne
Rotenone	5.7	ne	ne	ne	ne	ne	6.5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	6.5	ne	ne	6.8	ne	7.6	7.3	9.2	8.2	8.3	6.9	7.7
Tri-phenylphosphat	4.0	5.4	5.4	5.2	4.8	ne	ne	6.1	ne	ne	ne	4.2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	4.2	ne	3.6	3.4	4.6	6.0
Tebuconazol	4.3	4.0	6.0	5.6	ne	ne	ne	5.8	ne	ne	ne	5.1	ne	ne	ne	4.2	ne	ne	ne	ne	4.1	ne	3.9	2.5	3.3	5.3
Valproinsäure	ne	ne	ne	3.1	ne	3.0	3.2	4.0	4.0	ne	ne	ne	ne	4.0	3.2	ne	4.0	3.6	ne	ne	2.8	ne	2.7	3.1	3.3	4.3
Colchicin	7.3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	3.0	3.0	8.7	8.2	ne	8.1	ne	ne	4.3
Hexachlorphen	5.5	ne	5.7	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	5.4	5.1	nt	5.3	5.5	5.3	8.0
MPP <sup>+</sup>	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	6.3	7.1	3.6	5.1	4.4	ne
Paracetamol	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	2.5	3.4	3.5	2.8	2.8
Paraquat	4.5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	4.0	4.0	4.6	3.1	3.4	4.2	2.3
Rifampicin	4.0	ne	ne	4.8	4.6	ne	ne	7.1	ne	ne	ne	ne	ne	4.0	ne	4.6	ne	4.2	ne	ne	4.6	7.8	3.4	3.2	3.7	ne
Taxol	5.6	ne	7.3	7.4	ne	ne	8.0	6.7	ne	ne	ne	ne	ne	ne	8.0	ne	ne	8.2	4.0	9.2	6.8	ne	8.8	ne	ne	ne

Grün: Negativkontrollen; Rot: Bekannte DART-induzierende Substanzen; Blau: Substanzen mit organspezifischer Toxizität (blauer Rahmen); <sup>a</sup> Effekt ≥20% der Positivkontrolle (PC<sub>20</sub>); <sup>b</sup> Effekt ≥10% der Positivkontrolle (PC<sub>10</sub>); <sup>c</sup> Fold induction (FI) von 1.5; nt: Substanz wurde in dem Assay nicht getestet; ne: Kein Effekt wurde induziert

Vergleicht man die Ergebnisse des CALUX®-Assays mit den Daten des FET-Tests, so war der Zebraföhlings-Embryo in 44% der Fälle weniger empfindlich gegenüber den Substanzen, während in den restlichen Fällen ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. Unter Berücksichtigung der Hormon-Reporterzelllinien des CALUX®-Assays war der FET-Test nicht in der Lage, die durch PCB 180, Rifampicin und Taxol induzierte Toxizität zu bestimmen, während er nach Carbaryl, Rotenon, Triphenylphosphat und Tebuconazol Exposition zu einem übereinstimmenden Ergebnis führte. Die übrigen Substanzen, bei denen eine Modulation der nukleären Hormonrezeptoren festgestellt wurde, induzierten im FET-Test stärkere Reaktionen als im CALUX®-Assay (Valproinsäure und Hexachlorphen). Dies lässt sich als 67%ige Konkordanz zwischen den CALUX®-Hormonrezeptor-Zelllinien und dem FET-Test zusammenfassen. Im Vergleich dazu lassen sich zwischen den (Lipid-)Stoffwechselzelllinien und dem FET-Test nur 39%tige Konkordanz feststellen, die fast alle im Bereich der leichten bis nicht nachweisbaren Toxizität lagen. Die schwere Toxizität, die durch die Hexachlorphen Belastung im FET-Test induziert wurde, wurde von keiner der Reporter-Zelllinien zum gleichen Schweregrad registriert.

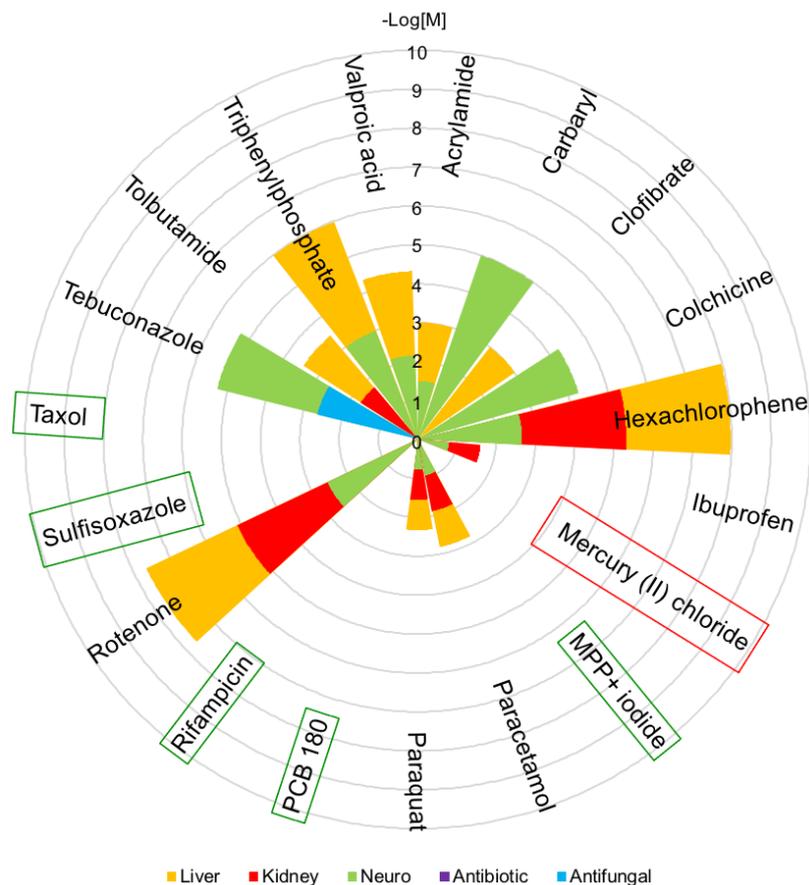


Abbildung 15. Radiales Balkendiagramm der FET-Test BMC<sub>10</sub> Werte [-Log[M]]. Grün: aufgrund von Löslichkeitsgrenzen werden keine Daten präsentiert; Rot: Substanz wurde in diesem Assay nicht getestet. Die Farbe(n) der Balken geben Aufschluss über beeinträchtigte Organe, für Substanzen mit mehr als einem Anwendungsbereich/Zielorgan gelten mehrere Farben

Die Auswertung der beiden Neurotoxizität-Assays (Abbildung 16) ergab, dass die am stärksten neurotoxischen Substanzen Colchicin, Hexachlorphen, Quecksilber(II)-chlorid, PCB 180, Rotenon und Taxol waren, während der NeuroTox-Test außerdem Carbaryl und MPP<sup>+</sup> als hochtoxisch einschätzte. Alle Substanzen, bei denen eine starke Toxizität festgestellt wurde, beeinträchtigen überwiegend die neuronale Entwicklung, während Substanzen, die in einem der beiden Tests eine mäßige Toxizität aufweisen, andere Zielorgane betreffen. Insgesamt induzierten 50% der hier getesteten Chemikalien den gleichen Schweregrad in den Neurotoxizitäts-Assays und dem FET-Test. Der FET-Test war in 28% der Fälle empfindlicher, während er nur in 22% weniger empfindlich war. Es zeigt sich, dass Substanzen mit geringer oder keiner neurotoxischen Wirkung auch im FET-Test als solche erkannt werden (z.B. Acrylamid, Paracetamol und Paraquat). In einigen Fällen, wie z. B. Triphenylphosphat, Tebuconazol oder Hexachlorphen, war der FET-Test empfindlicher, was darauf hindeutet, dass die Substanz nicht nur die neuronale Entwicklung beeinflusst. Insgesamt scheint es, dass der FET-Test neurotoxische Substanzen mit einer ähnlichen Empfindlichkeit wie die beiden ausgewählten, hier vorgestellten *In vitro*-Assays erkennen kann.

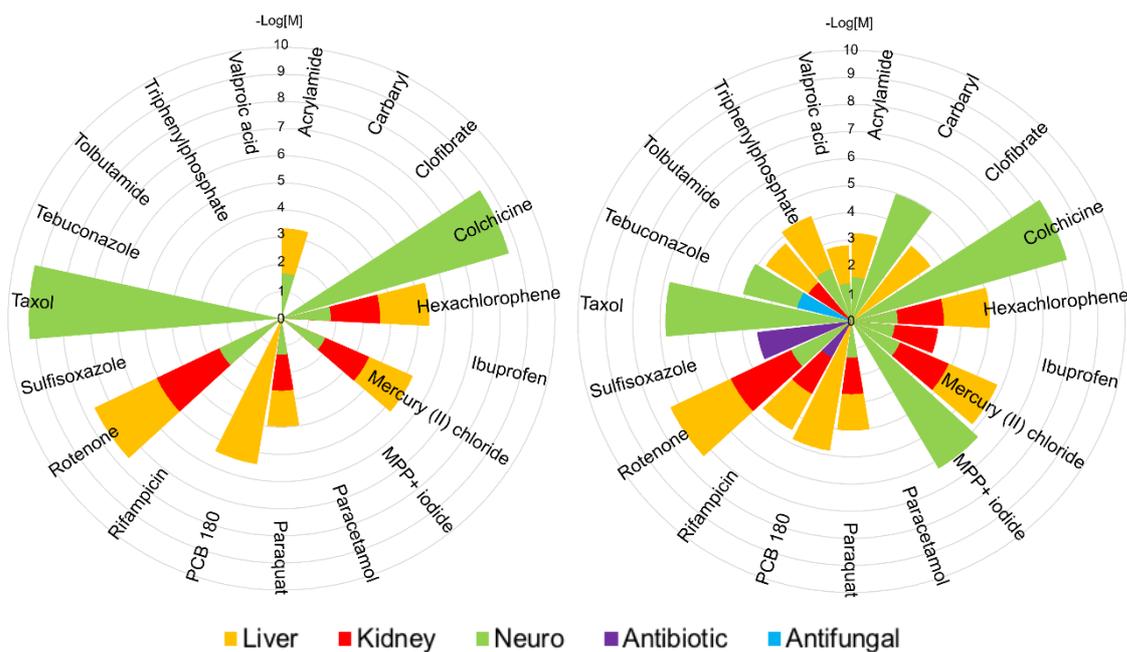


Abbildung 16. Radiale Balkendiagramme der cMINC Assay (Links) und NeuroTox Test (Rechts) BMC<sub>10</sub> Werte [-Log[M]]. Die Farbe(n) der Balken geben Aufschluss über beeinträchtigte Organe, für Substanzen mit mehr als einem Anwendungsbereich/Zielorgan gelten mehrere Farben

Bei der Bestimmung der Reaktionen auf Nierentoxizität (Abbildung 17) wies der HEK 293 Assay mehr Veränderungen auf als die RPTEC/TERT1-Zelllinie. In beiden Fällen wurde Rotenon als hoch toxisch bestimmt, während Colchicin, MPP<sup>+</sup>, Rifampicin und Valproinsäure nur in jeweils einem der beiden Assays starke Toxizität auslösten. Darüber hinaus wurden mäßig toxische Reaktionen nach Exposition mit Quecksilber(II)-chlorid, Hexachlorphen und Paraquat gemessen, während die übrigen Substanzen eine leichte bis keine Toxizität hervorriefen. Der HEK 293 erkannte alle Substanzen als toxisch, denen

ein Einfluss auf die Nierenfunktion bereits in der Literatur nachgewiesen wurde. Hier war der FET-Test in 39% der Fälle ähnlich empfindlich, während er in 28% der Fälle weniger empfindlich war. Rotenon führte im FET-Test und den Nieren-Assays zu gleichstarker Toxizität. Der FET-Test konnte die Effekte von Colchicin, MPP<sup>+</sup>, Rifampicin und Taxol nicht bestimmen, während er von Carbaryl, Hexachlorphen, Triphenylphosphat, Tebuconazol und Valproinsäure stärker beeinflusst wurde. Basierend auf den hier getesteten Substanzen scheint es, dass der FET-Test eine geringe Empfindlichkeit gegenüber nephrotischen Endpunkten hat.

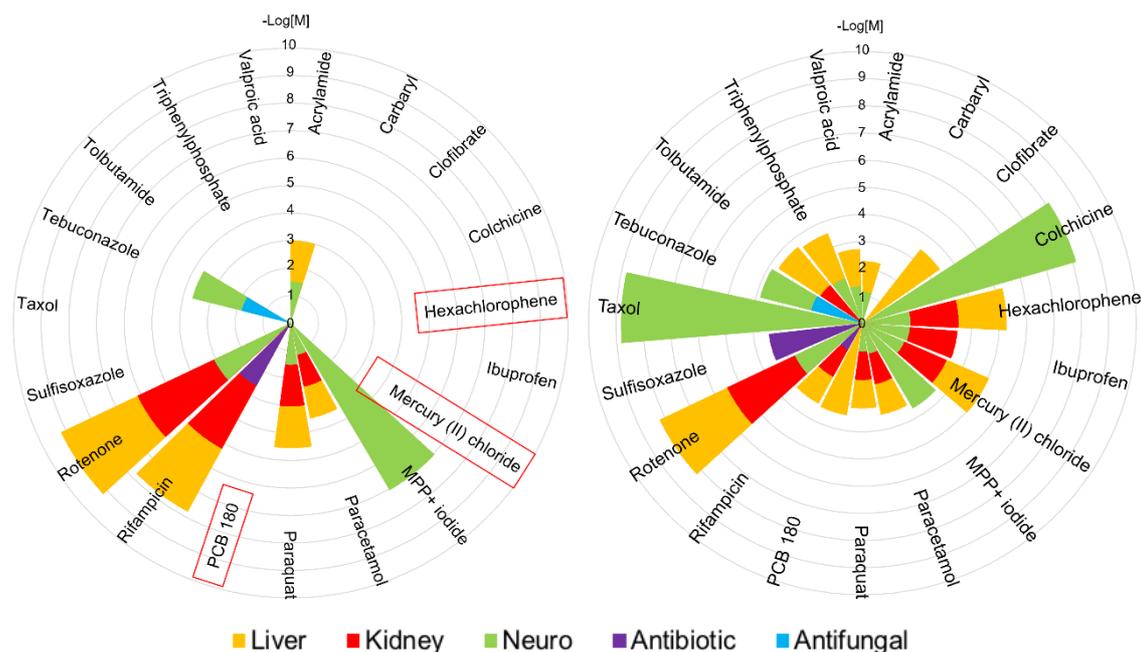


Abbildung 17 Radiale Balkendiagramme der RPTEC/TERT1 (Links) und HEK 293 (Rechts) Zellen-BMC<sub>10</sub> Werte [-Log[M]]. Rot: Substanz wurde in diesem Assay nicht getestet. Die Farbe(n) der Balken geben Aufschluss über beeinträchtigte Organe, für Substanzen mit mehr als einem Anwendungsbereich/Zielorgan gelten mehrere Farben

Nur Rotenon war in beiden Leberzelllinien hochgradig hepatotoxisch (Abbildung 18), während Clofibrat, Hexachlorphen und Quecksilber(II)-chlorid in mindestens einem der beiden Assays eine moderate Toxizität induzierten. Die einzigen Substanzen, welche in keiner der beiden Zelllinien eine Wirkung hervorriefen, waren Colchicin und Taxol, von denen nicht bekannt ist, dass sie Auswirkungen auf die Leber haben. Die übrigen Substanzen induzierten eine leichte Toxizität in mindestens einer der beiden Systeme. Der FET-Test ermittelte bei 39% der getesteten Substanzen den gleichen Schweregrad der Toxizität, während er in 28% der Fälle eine schwerere Toxizität feststellte. Die einzige Substanz, die ausschließlich auf die Leber wirkt, Clofibrat, wies nur in einer der beiden Leberzelllinien eine moderate Toxizität auf, und nur eine leichte Toxizität im FET-Test. In den Leberzelllinien wurde Hexachlorphen außerdem nur als mäßig toxisch bestimmt, während es im FET-Test als stark toxisch eingestuft wurde. Hier war der FET-Test in der Lage die meisten der bekannten hepatotoxischen Substanzen als toxisch zu bestimmen.

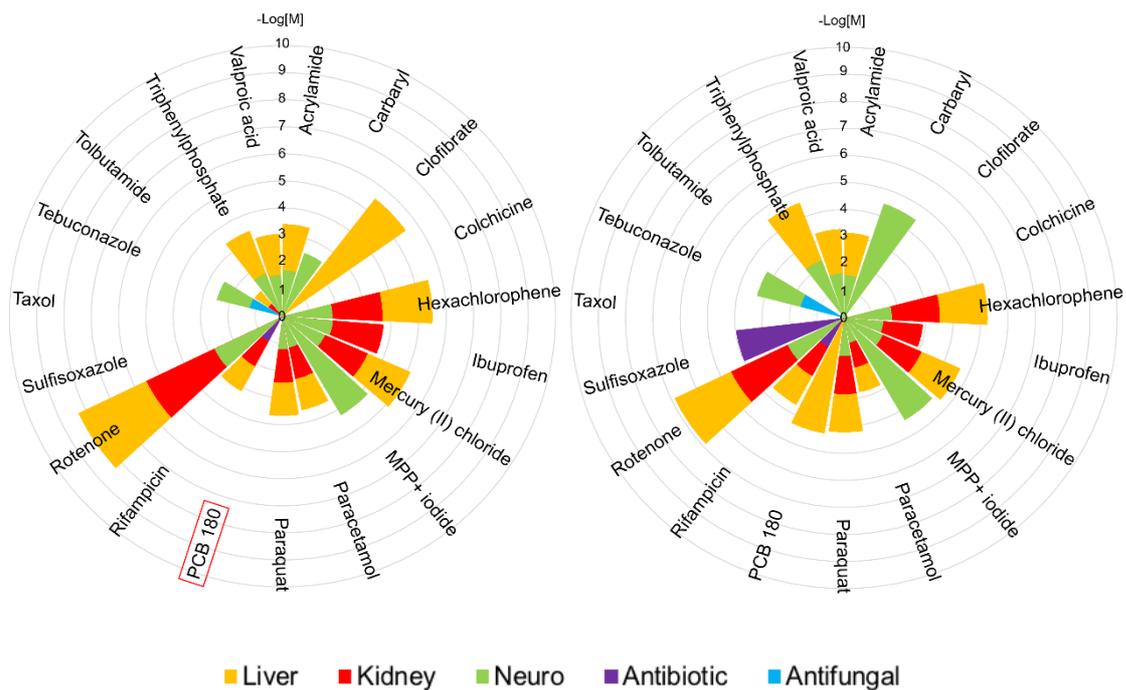


Abbildung 18 Radiale Balkendiagramme der iPSC hep (Links) und HepG2 (Rechts) Zellen-BMC<sub>10</sub> Werte [-Log[M]]. Rot: Substanz wurde in diesem Assay nicht getestet. Die Farbe(n) der Balken geben Aufschluss über beeinträchtigte Organe, für Substanzen mit mehr als einem Anwendungsbereich/Zielorgan gelten mehrere Farben

### 3.3.3 Unterschiede in der Toxizität der Substanzen im FET-Test und den *In vitro*-Assays

Im vorliegenden Kapitel wurde gezeigt, dass, zwar viele der Substanzen einen ähnlichen Schweregrad an Toxizität in den Assays hervorriefen, dies aber nicht pauschal für alle Substanzen behauptet werden kann. So verursachte **Colchicin** beispielsweise in beiden Neurotoxizitäts-Assays starke Reaktionen und führte im HEK 293 Assay zu starker Nephrotoxizität, während es im FET-Test nur eine mäßige Entwicklungstoxizität verursachte. Colchicin hemmt die Polymerisation von Mikrotubuli durch Bindung an Tubulin und verursacht dadurch eine Spindelvergiftung (Avila u. a., 1987; Farrell und Wilson, 1980; Roche u. a., 1993). Ihm werden auch entzündungshemmende Eigenschaften zugeschrieben, da es die Motilität und Aktivität von Neutrophilen hemmt und auf das autonome Nervensystem wirkt (Roche u. a., 1994), was die starke Reaktion in den neuronalen *In vitro*-Tests erklären könnte. Trotz einiger Nagetierstudien ist über die Wirkungsmechanismen wenig bekannt und nur wenige Informationen über die Toxizität in Fische liegt vor. In einer Studie wurde festgestellt, dass die Toxizität von Colchicin mit der Expositionsdauer stark zunimmt (Roche u. a., 1994), was damit erklärt wurde, dass Fische zunächst nicht in der Lage sind, Colchicin zu dem Metaboliten Oxycolchicin zu oxidieren, der noch schädlicher ist als die Ausgangssubstanz (Derivaux und Lieguois, 1962). Dies wurde durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt, da der FET-Test eine statistisch signifikante Zunahme der Toxizität im Laufe der Zeit zeigte.

**PCB 180** zeigte eine starke Androgen- und Progesteronrezeptor Aktivierung, war mäßig neuro- und hepatotoxisch, verursachte aber keine Reaktion im FET-Test. PCB 180 gehört zur Familie der polychlorierten Biphenyle, Substanzen, die häufig in Kühlflüssigkeiten verwendet werden (Rossberg u. a., 2006) und von denen bekannt ist, dass sie aufgrund ihrer persistenten und lipophilen Natur bioakkumulieren (Belpaire u. a., 2011). PCBs sind krebserregend für Mensch und Tier und sind bekannte endokrine Disruptoren (Boas u. a., 2006; Winneke u. a., 1998). Die meisten Untersuchungen zur Toxizität von PCBs auf aquatische Organismen basierten auf Feldversuchen, die die Akkumulation von PCBs untersuchten (z. B. Skarphedinsdottir et al. 2010; Belpaire et al. 2011; Abdallah and Elmagd Morsy 2013; Unyimadu, Osibanjo, and Babayemi 2018; Terzopoulou and Voutsas 2017). In den Langzeitstudien wurden niedrige Assimilationsraten (Stapleton u. a., 2004), verminderter Fortpflanzungserfolg (Daouk u. a., 2011) und erhöhte Motilität bei den Nachkommen PCB-exponierter Individuen festgestellt (Péan u. a., 2013). In einem *In vitro*-Assay wurde festgestellt, dass die PCB-Exposition den Zelltod durch erhöhten oxidativen Stress verursacht (Abella u. a., 2015). *In vivo*-wurde festgestellt, dass bei männlichen Ratten, die PCB 180 ausgesetzt waren, eine Verhaltenshemmung sowie erniedrigte Serum-Schilddrüsenhormone und veränderte Retinoid-Spiegel in Gewebeproben auftraten (Viluksela u. a., 2014). Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass PCB 180 zwar ein Toxikum ist, seine Wirkung aber erst nach Langzeitexposition deutlich wird, wodurch sich der FET-Test für die Bestimmung der Toxizität hier weniger geeignet.

Im CALUX®-Assay verursachte **Taxol** starke Reaktionen bei Androgen-, Progesteron- und Schilddrüsenantagonisten-Rezeptorhormonen sowie bei den Proteinstresswegen p21 und p53 und einem Lipidstoffwechselgen (PRX). Es erwies sich als neurotoxisch im cMINC-Assay und im NeuriTox-Test, zusammen mit schwerer Nephrotoxizität im HEK 293-Assay. Im FET-Test hingegen löste das Chemotherapeutikum (Hyperstabilisierung von Mikrotubuli; National Center for Biotechnology Information, 2020) keine Reaktion aus. Seine Bestimmung als neurotoxisch im vorliegenden Kapitel lässt sich durch eine der bekannten Nebenwirkungen von Taxol erklären: periphere Neuropathie (Seretny u. a., 2014). In früheren Studien wurde festgestellt, dass die Exposition gegenüber dem Wirkstoff eine reduzierte Pigmentierung und eine vergrößerte Dottersackgröße bei Zebrafisch-Embryonen verursacht (Gao u. a., 2014), während eine injektionsbasierte Belastung von larvalen und adulten Zebrafischlingen zu Epithelschäden und eine verringerte mechanische Stressresistenz führte (Lisse u. a., 2016). Diese Befunde weisen also darauf hin, dass der FET-Test in diesem Fall zu einer Falsch-negativ-Reaktion führte, was möglicherweise daran liegt, dass sowohl Neuro- als auch Nephrotoxizität auf einer rein makroskopischen Skala schwer zu beobachten sind. Das wiederum deutet darauf hin, dass solche Substanzen weitere Tests (z. B. histologisch, verhaltensmäßig und biochemisch) im Zebrafisch-Embryo erfordern würden, selbst wenn der FET-Test ein negatives Ergebnis liefert.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse haben die Anwendbarkeit des FET-Tests in Bezug auf DART-Detektion weiter unterstrichen. Während sich der Zebrafisch-

Embryo durch den Nachweis morphologischer Veränderungen als empfindlich gegenüber verschiedenen teratogenen Substanzen erwiesen hat, hat der Vergleich mit spezielleren *In vitro*-Testsystemen, die auf die Entwicklung von Neuriten, die Migration von Neuralleistenzellen und die Leber- und Nierenentwicklung fokussieren, einen weiteren Beweis für die Empfindlichkeit des Tests geliefert. Der Vergleich der Daten des Zebrafisch-Embryos mit den *In vitro*-Tests lässt die Schlussfolgerung zu, dass er die Erkennung von Substanzen mit reprotoxischem Potenzial mit einiger Sicherheit ermöglicht. Insbesondere wenn man bedenkt, dass im Embryo kein Endpunkt, der die Reproduktion betrifft, auf rein makroskopischer Basis analysiert werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die Beobachtung rein morphologischer Veränderungen im Zebrafisch-Embryo in mindestens 50% der Fälle ebenso empfindlich war, um neuro-, nephro- und hepatotoxische Substanzen in mindestens dem gleichen Schweregrad nachzuweisen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Anwendbarkeit des Zebrafisch-Embryos für aktuelle DART-Forschungsfragen. Mit der Hinzufügung von gezielteren Endpunkten zum FET-Test oder der zusätzlichen Verwendung von transgenen Zebrafisch-Linien, die auf die Bewertung z.B. des Pronephros durch *In vivo*-Fluoreszenz-Imaging von *dzip11*-inhibitierten *Tg(wt1b:egfp)* transgenen Embryonen zugeschnitten sind (Gehrig u. a., 2018). Während also die Bewertungsmethoden noch einer Feinabstimmung bedürfen und das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Toxizität für viele Substanzen noch unvollständig ist, konnte dem Zebrafisch-Embryo im FET-Test seine Anwendbarkeit für die Erforschung von DART-Endpunkten im vorliegenden Kapitel nachgewiesen werden.

### 3.4 Die Empfindlichkeit des Coiling-Assays für die potenziell neurotoxischen Substanzen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Sensibilität und Vielseitigkeit des FET-Tests bereits im Detail beschrieben. Um jedoch weiter zu erläutern, ob spezifische Endpunkte des FET-Tests auf spezielle Toxizitätsmechanismen hinweisen, bedarf es weitere Untersuchungen. Hierzu wurde Kopftremor als wahrscheinlicher FET-Test Endpunkt für Neurotoxizität ausgewählt, um in einer Verhaltensstudie genauer analysiert zu werden. Frühe lokomotorische Reaktionen werden längst z. B. im Coiling Assay verwendet, um neurotoxische Effekte während früher Entwicklungsstadien des Zebrafischlings nachzuweisen (Basnet u. a., 2019; Ramlan u. a., 2017; Selderslaghs u. a., 2013, 2010; Vliet u. a., 2017; Zindler u. a., 2019b). Die im folgenden getesteten Substanzen sind: (1) Carbaryl, ein AChE-Inhibitor (Schock u. a., 2012); (2) Hexachlorphen, ein Antimikrobium, von dem bekannt ist, dass es Defekte im Zentralnervensystem von Ratten verursacht (Kimbrough, 1971), die höchstwahrscheinlich durch Myelinopathie hervorgerufen werden (Jokanovic, 2009); (3) Ibuprofen, von dem festgestellt wurde, dass es das Verhalten von sich entwickelnden Zebrafischlingen durch eine signifikante Abnahme der frühen Lokomotion und des Schlüpfens beeinflusst (Xia u. a., 2017); (4) Rotenon, ein Pestizid, das häufig in Studien zur Parkinson-Krankheit eingesetzt wird (Betarbet u. a., 2000; Le Couteur u. a., 1999); und (5) Acrylamid, das in der Industrie und der Wasseraufbereitung weit verbreitet ist (Friedman, 2003), als Positivkontrolle für chronische Neurotoxizität (LoPachin und Gavin, 2008; Spencer und Schaumburg, 1975), da bekannt ist, dass es proteomische und transkriptomische Veränderungen des zentralen Nervensystems auslöst, zusätzlich zur Induktion von depressionsähnlichem Verhalten in Zebrafischlingen (Faria u. a., 2018).

Die verwendeten Testkonzentrationen sind in Tabelle 11 angegeben. Die Testkonzentrationen wurden wie folgt festgelegt: (i) die höchste Konzentration wurde so gewählt, dass sie zwischen der  $EC_{50}$  und den  $LC_{10}$  liegt, um sicherzustellen, dass Wirkungen ohne Letalität beobachtet werden können, (ii) die beiden folgenden Konzentrationen folgen dem  $EC_{50}$  bzw.  $EC_{10}$  und (iii) die niedrigste getestete Expositionskonzentration sollte immer deutlich unter dem  $EC_{10}$  liegen.

Tabelle 11. Testkonzentrationen [mg/l] des Coiling-Assays für die getesteten Substanzen

Substanzen	Testkonzentrationen [mg/l]	Medium
Acrylamid	7.5, 75, 90, 150	SW
Carbaryl	0.3, 3, 6, 7.5	0.5% DMSO
DMSO	0.01%, 0.1%, 0.5%, 5%	SW
Hexachlorphen	0.0004, 0.004, 0.008, 0.02	0.1% DMSO
Ibuprofen	0.3, 3, 10, 30	SW
Rotenon	0.0004, 0.004, 0.008	0.1% DMSO

SW: Standardisiertes Wasser.

### 3.4.1 Der Nachweis von Neurotoxizität im Coiling-Assay

DMSO wurde als Lösungsmittel verwendet, aber auch als eigenständige Substanz getestet, da es immer wieder Diskussionen über die Wirkung von Lösungsmitteln auf Entwicklungs- und Verhaltensendpunkte gibt (Maes u. a., 2012; Turner u. a., 2012). Dies ist von besonderem Interesse bei einem so empfindlichen Testsystem wie dem Coiling Assay (Hallare u. a., 2006). Nur eine Exposition von 5% DMSO induzierte eine signifikante Hemmung beider Coiling-Parameter, die übrigen DMSO-Konzentrationen keinen signifikanten Effekt hatten (Abbildung 19). Eine Tabelle mit allen signifikanten  $p$ -Werten für die folgenden Abbildungen befinden sich in Annex III, Tabelle 1. Studien stellten fest, dass DMSO bereits nach einer Exposition von 0,01% Veränderungen auf Protein- und Molekularebene hervorruft (Turner u. a., 2012), während Verhaltensänderungen bei verschiedenen Zebrafisch-Linien bereits bei >0,55% DMSO beobachtet wurden (Christou u. a., 2020), mit geringen Raten von reduziertem Schlupf oder Deformationen ab 1% DMSO (Chen u. a., 2011). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass niedrige Konzentrationen von DMSO keine signifikanten Verhaltensänderungen induzieren, was mit den Ergebnissen früherer Versuche übereinstimmte (Chen u. a., 2011; Christou u. a., 2020). Da jedoch auch hier geringe Abweichungen von der unbehandelten Kontrollgruppe auftraten, ist es ratsam, eine Lösungsmittel-Kontrollgruppe im Single-Plate-Coil-Assay zu verwenden, um mechanistische Veränderungen allein auf Basis der Substanzexposition beurteilen zu können.

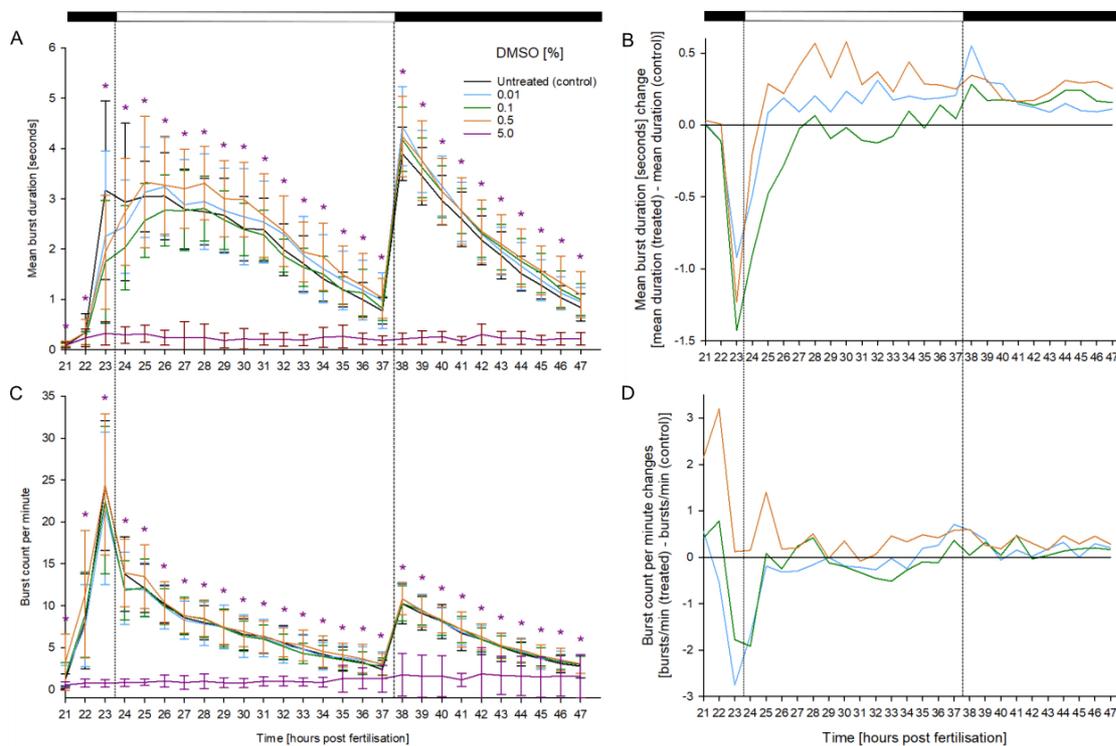


Abbildung 19. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von DMSO ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle

Die Acrylamid-Exposition erhöhte signifikant die Anzahl der burst-count-per-minute in den späteren Phasen des Coiling-Assays, nach dem Beginn der zweiten Dunkelphase, während die mean-burst-duration unbeeinflusst blieb (Abbildung 20). In Studien wurde festgestellt, dass Acrylamid-Exposition das Auftreten eines "depressiven" und eines "angstähnlichen" Phänotyps bei 5 Tage alten Zebrabärblingen induziert (Faria u. a., 2019b, 2018; Prats u. a., 2017). Ähnliche Beobachtungen wurden bei Ratten gemacht, wo verminderte Spiegel der Monoamin-Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin und Dopamin gemessen wurden (Dixit u. a., 1981; Raushan u. a., 1987), die mit den oben genannten Verhaltensänderungen in Verbindung gebracht wurden (Ruhé u. a., 2007). Hier könnte die anfängliche Reduktion sowohl der burst-duration auch der burst-count-per-minute, gefolgt von einer Periode des Anstiegs beider Parameter, auf die expositionsinduzierte Neurotransmitter-Erschöpfung hinweisen. Eine frühere Studie ergab, dass Noradrenalinmangel bei Zebrabärblingen erhöhte Schlafphasen und -dauer induzierte, während sie die Fortbewegung negativ beeinflusste (Singh u. a., 2015).

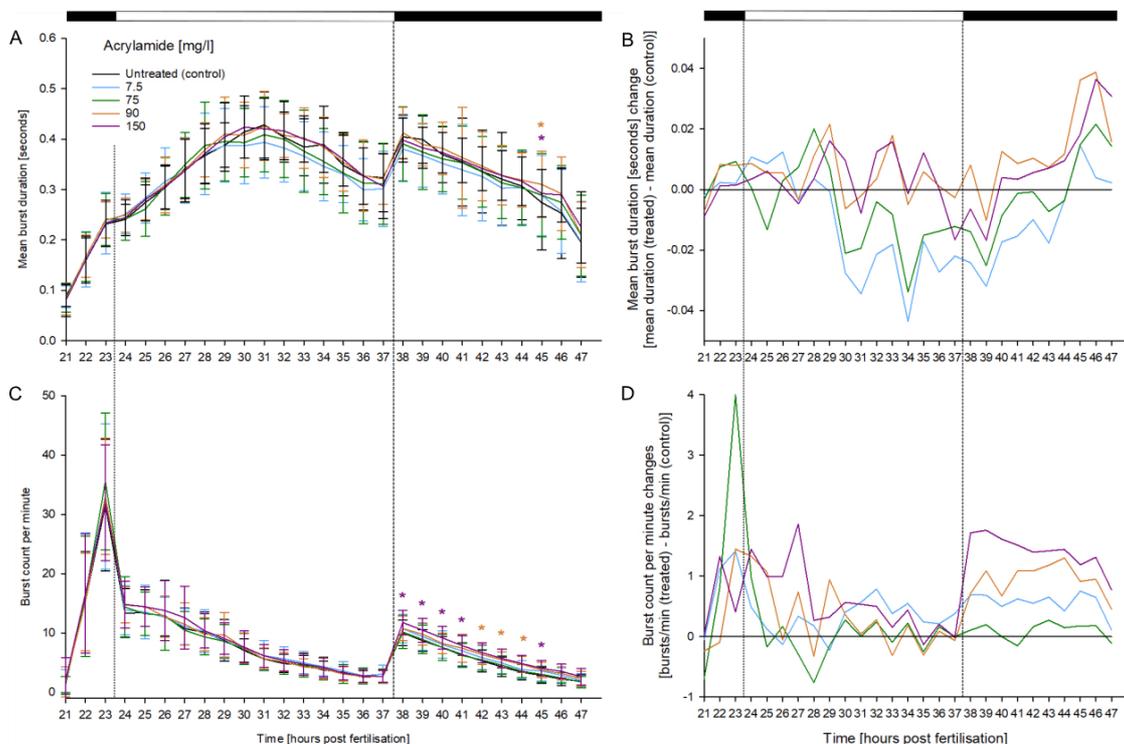


Abbildung 20. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Acrylamid (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle

Die Ibuprofen-Exposition induzierte eine Hypoaktivität in beiden beobachteten Parametern, wobei die Anzahl der burst-count-per-minute signifikant reduziert war (Abbildung 21). Ibuprofen wirkt über die Hemmung von COX-Enzymen (Bartoskova u. a., 2013), die während der frühen Embryonalentwicklung notwendig sind, da sie eine Vielzahl von Hormonen und Prozessen während der Embryogenese regulieren (Grosser u. a., 2002). Somit könnte die Ibuprofen-induzierte COX-Hemmung auch das Coiling-Verhalten beeinflussen.

Dafür spricht auch die Tatsache, dass Embryonen das Coiling als Teil des Schlupfes ausprägen (Xia u. a., 2017) und die Ibuprofen-Exposition darüber hinaus in dem zuvor durchgeführten FET-Test (von Hellfeld u. a., 2020) reduzierte Schlupfraten verursachte, während sie auch die Burstzahl pro Minute deutlich dosisabhängig beeinflusste.

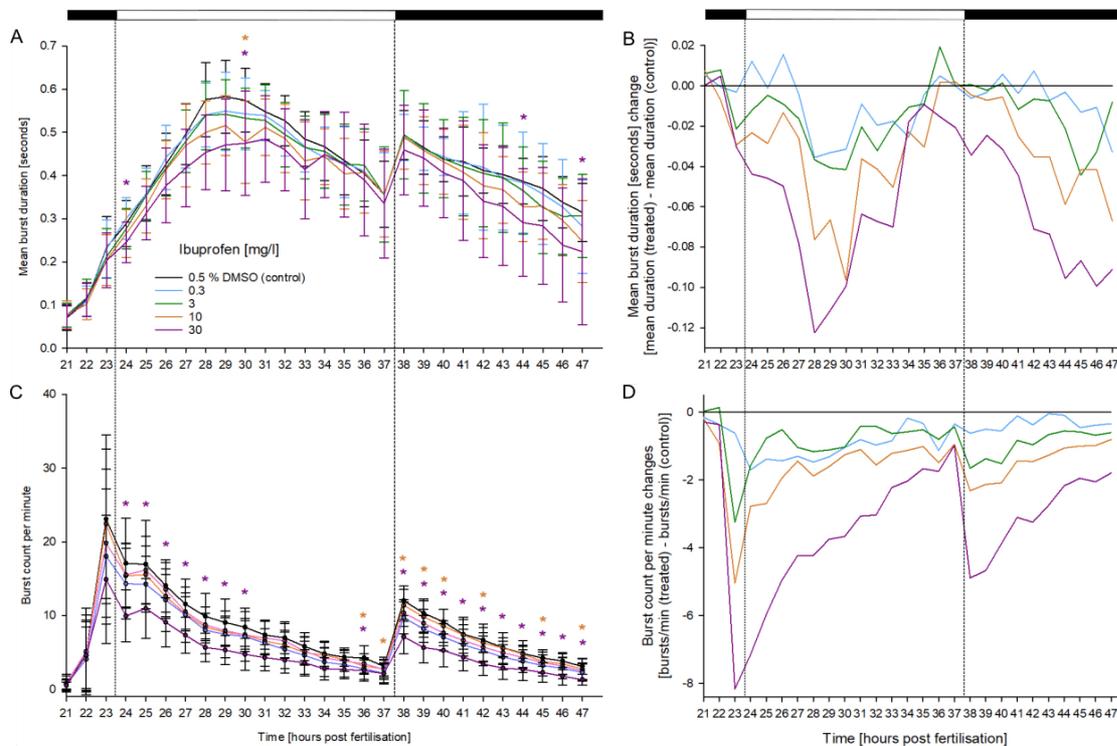


Abbildung 21. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Ibuprofen (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle

Bei den übrigen Substanzen waren die induzierten Effekte schwieriger zu bewerten, da viele Individuen eine stark erhöhte Gesamtaktivität zeigten, die das Tracking-Programm nicht analysieren konnte, was zum Ausschluss dieser Individuen aus der Analyse führte. Die Carbaryl-Exposition führte zu einem signifikanten Anstieg der beobachteten burst-count-per-minute ab 23 hpf, mit geringerem Einfluss auf die mean-burst-duration (Abbildung 22). Aufgrund der allgemeinen Hyperaktivität, die ab 30 hpf beobachtet wurde, konnten die statistischen Trends jedoch nicht über die gesamte Versuchsdauer bestimmt werden. Der AChE-Inhibitor hat in der Vergangenheit in verschiedenen Verhaltens-Assays die Aktivität von exponierten Organismen erhöht (Andrieux u. a., 2004; Behra u. a., 2002; Lin u. a., 2007; Mandal, 2005; Schock u. a., 2012; Slaninova u. a., 2009). Darüber hinaus wurden auch andere AChE-hemmende Substanzen erfolgreich im Rahmen des Coiling-Assays eingesetzt (z. B. Zindler et al., 2019a), was die Anwendbarkeit des Assays zum Nachweis von AChE-hemmungsbedingten Verhaltensveränderungen verdeutlicht. Darüber hinaus wurde in einer früheren Studie festgestellt, dass Carbaryl-exponierte Medaka-Embryonen nach taktilem Stimulus unwillkürliche Muskelkrämpfe zeigen (Carlson u. a., 1998). Obwohl in den vorliegenden Experimenten keine taktilen Reize gegeben wurden, kann nicht

ausgeschlossen werden, dass im Inkubator erzeugte Vibrationen oder Lichtveränderungen ähnliche unwillkürliche Reaktionen bei dem Zebraärbling auslösen könnten.

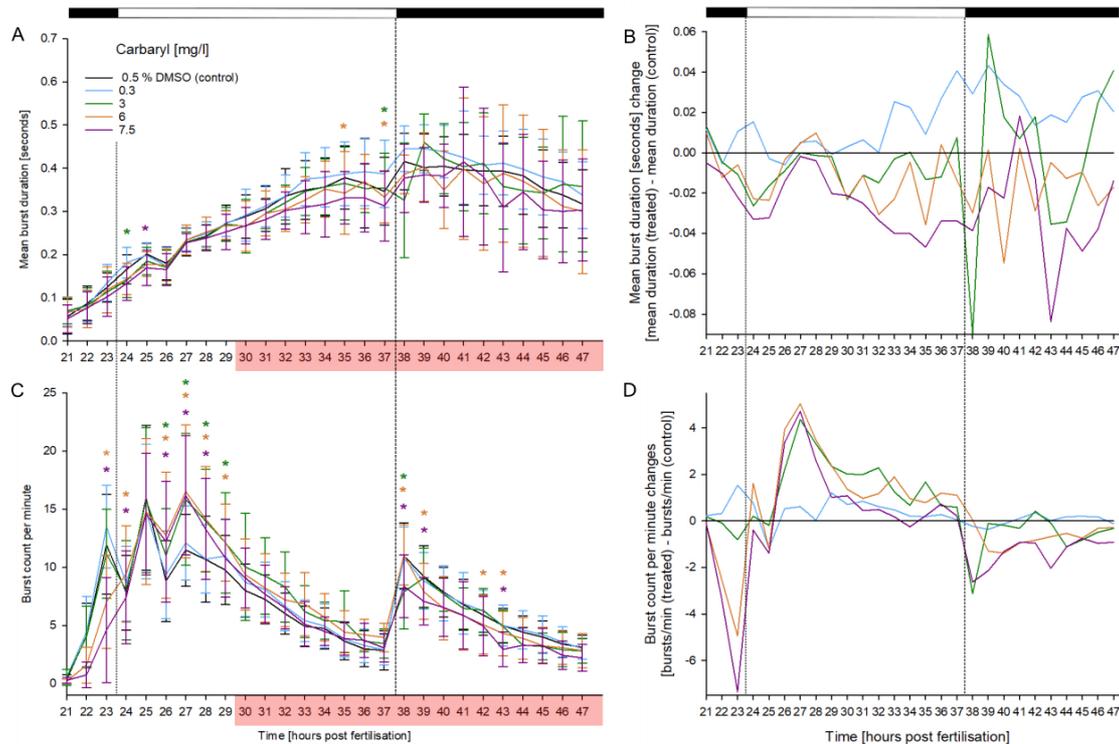


Abbildung 22. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Carbaryl (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle. Rot:  $\geq 20\%$  der Individuen mindestens einer Konzentrationsgruppe wurden von der Auswertung ausgeschlossen

Die Hexachlorphen-Exposition induzierte eine vorübergehende Hyperaktivität (zwischen 29 und 38 hpf), mit wenig signifikanten Befunden vor und nach dem fraglichen Zeitfenster (Abbildung 23). In Untersuchungen, die auf einer versehentlichen Hexachlorphen-Exposition beim Menschen beruhen, wurden Störungen des zentralen Nervensystems und strukturelle Hirndeformationen festgestellt (Martin-Bouyer u. a., 1982; Powell u. a., 1973; World Health Organisation, 2006). Eine frühere Studie, die mit Mäusen und Pavianen durchgeführt wurde, ergab, dass die Hexachlorphen-Exposition zu Lethargie und verminderter Aktivität führte, bevor sie bei Krampfanfällen zur Letalität führte (Tripiet u. a., 1981). Es konnten jedoch keine weiteren Studien mit Zebraärblingen für diese Substanz gefunden werden.

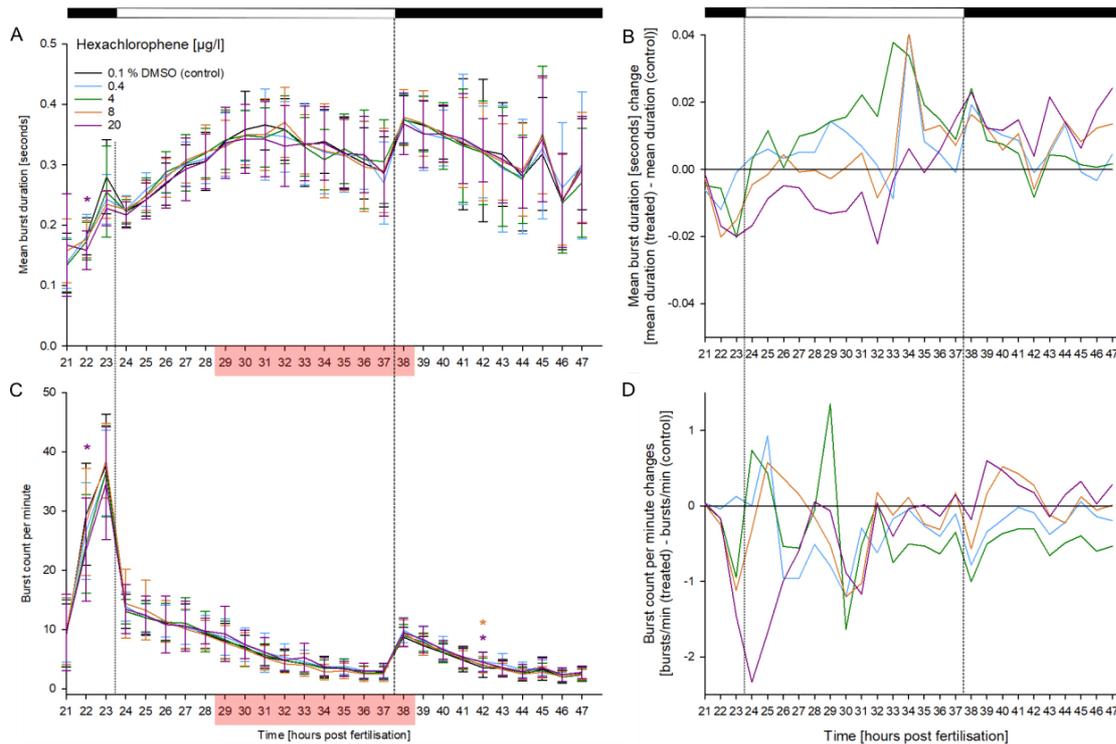


Abbildung 23. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Hexachlorophen (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikate). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle. Rot:  $\geq 20\%$  der Individuen mindestens einer Konzentrationsgruppe wurden von der Auswertung ausgeschlossen

Interessanterweise induzierte die Rotenon-Exposition zunächst eine Reduktion der beiden gemessenen Coiling-Parameter mit einer zeitweiligen statistischen Signifikanz. Ab 30 hpf wurde jedoch eine extreme Hyperaktivität beobachtet, die eine schlüssige statistische Analyse der Parameter unmöglich machte (Abbildung 24). Bei Zebraquärlingen ist bekannt, dass Rotenon motorische und nicht-motorische Parkinson-ähnliche Symptome auslöst (Betarbet u. a., 2000; Le Couteur u. a., 1999), die mit verminderten Dopaminwerten im Gehirn der exponierten Organismen einhergehen (Wang u. a., 2017). Es wird angenommen, dass Rotenon dieses Verhalten aufgrund einer mitochondrialen Komplex-I-Hemmung hervorruft, die zu einer erhöhten mitochondrialen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt (Li u. a., 2003).

Die Wechselanalyse beim Einsetzen der Dunkelheit (Abbildung 25) verdeutlicht die insgesamt stärkere Wirkung der Substanzen auf den burst-count-per-minute Parameter während des Lichtwechsels. Die Exposition mit  $\geq 90$  mg/l Acrylamid führte zu einem Anstieg über den  $SC_{10}$  hinaus, während die Exposition mit  $< 5\%$  DMSO keine solcher Effekte induzierte. Nur die niedrigste Ibuprofen-Expositionskonzentration induzierte keine signifikante Verhaltensänderung zu diesem Zeitpunkt, wobei die höchste Expositionskonzentration sich dem  $SC_{50}$  näherte.

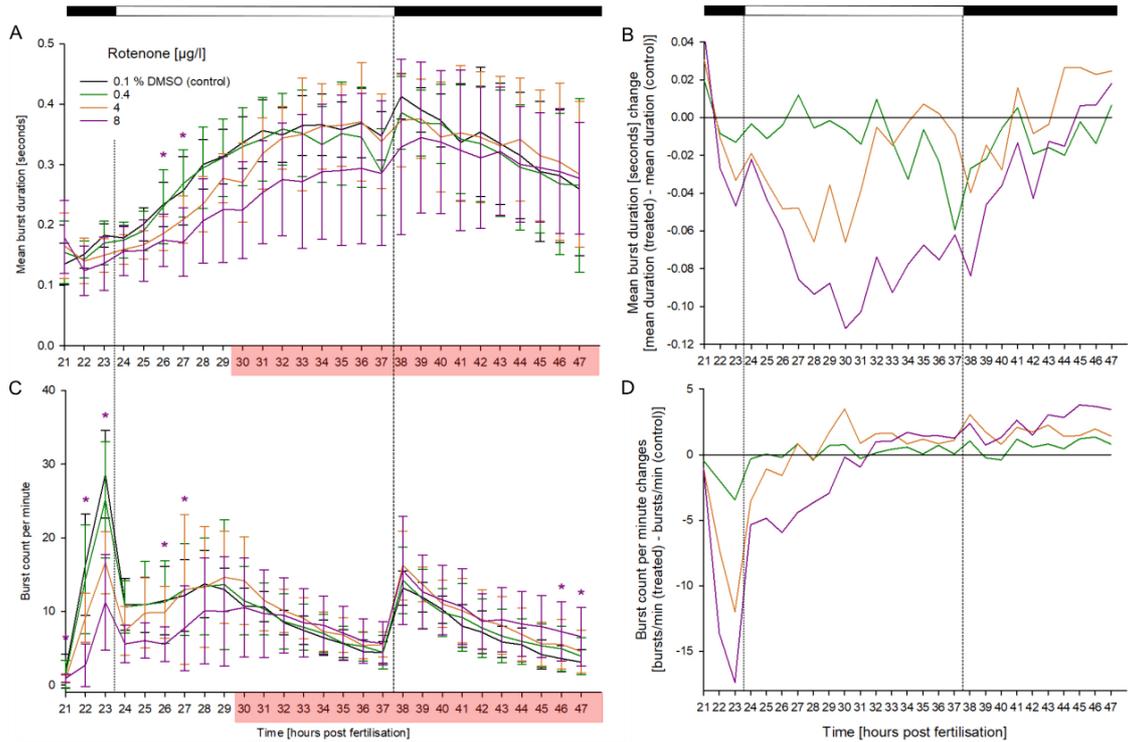


Abbildung 24. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Rotenon ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle. Rot:  $\geq 20\%$  der Individuen mindestens einer Konzentrationsgruppe wurden von der Auswertung ausgeschlossen

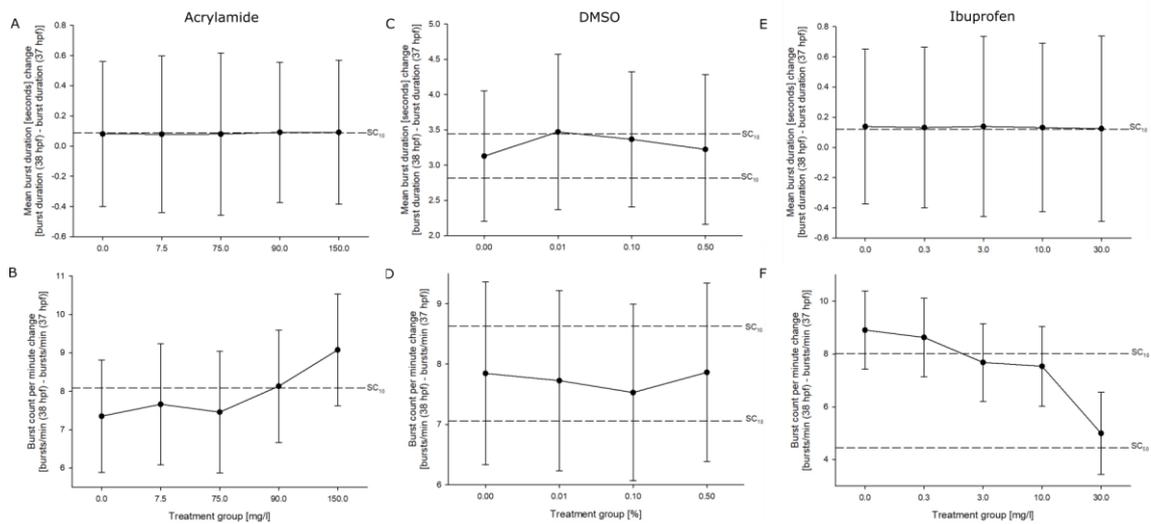


Abbildung 25. Die Auswirkungen von Acrylamid (A, B), DMSO (C, D) und Ibuprofen (E, F) auf die Verhaltensänderung während des Lichtzykluswechsels. Der Unterschied der mean-burst-duration [Sekunden] (A, C, E) und burst-count-per-minute (B, D, F) von 37 bis 38 hpf von Zebrafisch-Embryonen ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). Die Daten wurden als Differenz zwischen den beiden Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung berechnet.  $SC_{10}$  und  $SC_{50}$  geben einen Schwellenwert für 10 bzw. 50% Abweichung von den Kontrollen an

Während der Coiling-Assay erfolgreich Verhaltensänderungen messen konnte, sind dramatische Aktivitäts-Steigerungen zwar beobachtbar, können aber mit der derzeit verfügbaren Software nicht ausgewertet werden. Der Coiling-Assay birgt großes Potenzial für Neurotoxizitätstests, besonders im Rahmen einer Testbatterie, da hier Vergleich mit spezialisierten Assays (wie z. B. des *In vitro*-Neurotoxizitätsassay NeuriTox (Delp u. a., 2018) oder dem PeriTox-Test (Hoelting u. a., 2016)) ermöglichen würde. Die Fähigkeit der in der hier verwendeten Software, verschiedene Parameter zu analysieren, beweist, dass nicht alle Substanzen jeden Parameter gleichermaßen beeinflussen. Mit einer Weiterentwicklung der Software, die beispielsweise auch die Analyse von einzelnen Individuen ermöglicht, wäre ein weiterer Schritt zu einer umfassenden Toxizitätsprüfung getan. Darüber hinaus ist aufgrund der kurzen Versuchsdauer und des geringen Zeit- und Kostenaufwands der zeitintensivste Aspekt des Coiling-Assays die Videoauswertung und die anschließende Datenanalyse. Wenn dieser Schritt (halb-)automatisiert werden würde, könnte der Coiling-Assay eine alternative Testmethode mit hohem Durchsatz für Neurotoxizitätstests sein. Schließlich erlaubt der derzeitige Versuchsaufbau zwar nicht die Unterscheidung zwischen Neurotoxizität und Entwicklungsneurotoxizität, doch könnten Modifikationen der Assays diese Unterscheidung ermöglichen. Die Entwicklungstoxizität könnte auch nach Beendigung der Exposition beobachtet werden, da sie durch eine aktive Veränderung der Strukturen und der Entwicklung induziert wird. Daher könnte die Verringerung der Exposition für Substanzen, die als entwicklungsneurotoxische Substanzen vorhergesagt werden, genutzt werden. Neurotoxizität hingegen wird z. B. durch die Blockierung von Rezeptoren hervorgerufen, die auch bei kürzerer Exposition sichtbar sein könnte und nach der Erholung auf das unbehandelte Niveau zurückgehen sollte.

### 3.5 Der Einfluss verschiedener Aufzuchtichten auf das Coiling-Verhalten

Basierend auf den Erkenntnissen des vorherigen Kapitels wird hier die Hypothese aufgestellt, dass sich die Reaktion des Zebrabärblings-Embryos im Coiling Assay unterscheidet, je nachdem ob die Embryonen in einer Gruppe oder getrennt voneinander aufgezogen werden. Dies beruht auf Beobachtungen anderer aquatischer Organismen, bei denen pränatale Kommunikation nachgewiesen wurden (Nishide und Tanaka, 2016). Aubret et al. (2016) zeigte beispielsweise, dass die Embryonen der Wassernatter (*Natrix maura*) über die Vibration ihres eigenen Herzschlags kommunizieren und diesen als Hinweis auf ihren Stoffwechsel nutzen, so dass sich die Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien aneinander anpassen und gleichzeitig schlüpfen können. Es wird angenommen, dass diese "catch-up"-Hypothese die Überlebenschancen der Individuen erhöht, indem sie in größerer Zahl schlüpfen (Doody, 2011). Da es nicht auszuschließen ist, dass der Zebrabärblings-Embryo ein ähnliches Verhalten zeigt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die exzessive Bewegung eines Individuums auf alle Embryonen in einem übertragen werden kann. Es wurden Teflon Platten mit definierten Abständen für jeden Embryo verwendet, um den direkten Kontakt zwischen den Embryonen zu vermeiden. Daher wurde das Coiling Verhalten von räumlich getrennten und gruppierten Embryonen zwischen 21 und 47 hpf unter Exposition mit dem mitochondrialen Komplex-1-Inhibitor Rotenon bei ansonsten unveränderten Versuchsbedingungen verglichen. Ziel war es, die Möglichkeit einer Kommunikation zwischen den Embryonen vor dem Schlüpfen zu beurteilen, die mit dem Coiling Assay gemessen werden könnte. Informationen zu Tierhaltung und dem Coiling Assay sowie der räumlichen Trennung der Embryonen sind in Kapitel 2 zu finden.

Das Verhaltensprofil der gruppierten Embryonen in Abbildung 24 wurde bereits besprochen. Individuen, die mit 8 µg/l Rotenon exponiert wurden, zeigten eine signifikante Verringerung sowohl des mean-burst-duration (Abbildung 24A) als auch des burst-count-per-minute Parameters (Abbildung 24B). Dieser Trend der verringerten Coiling-Dauer mit zunehmender Konzentration der mean-burst-duration ist auch aus der normalisierten Datendarstellung ersichtlich (Abbildung 24C). Vor 30 hpf ist dies auch bei der Betrachtung der normalisierten burst-count-per-minute zu erkennen. Hier näherten sich die Individuen jedoch der in der Kontrollgruppe beobachteten burst-count-per-minute an (Abbildung 24 D). Ab 30 hpf wurden mehr als 20% der Organismen aufgrund von starker Hyperaktivität, die die Datenerfassung der Noldus-Software störte, aus der Analyse ausgeschlossen.

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse des Coiling-Assays, der mit räumlich getrennten Embryonen durchgeführt wurde. Hier wurden keine statistisch signifikanten Abweichungen in der burst-duration im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Abbildung 26A). Bei der Untersuchung der normalisierten Daten zeigten alle Behandlungsgruppen ähnliche burst-durations wie die Kontrollgruppe, wobei nur die niedrigste Expositionskonzentration (0,4 µg/l) eine statistisch nicht signifikante Reduzierung des Parameters zeigte (Abbildung 26B). Auch die Anzahl der burst-count-per-minute wurde durch Rotenon-Exposition bei

den getrennten Individuen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe nicht beeinflusst (Abbildung 26C). Diese allgemeine Homogenität des Parameters ist ebenso gut in der normalisierten Datendarstellung zu beobachten (Abbildung 26D).

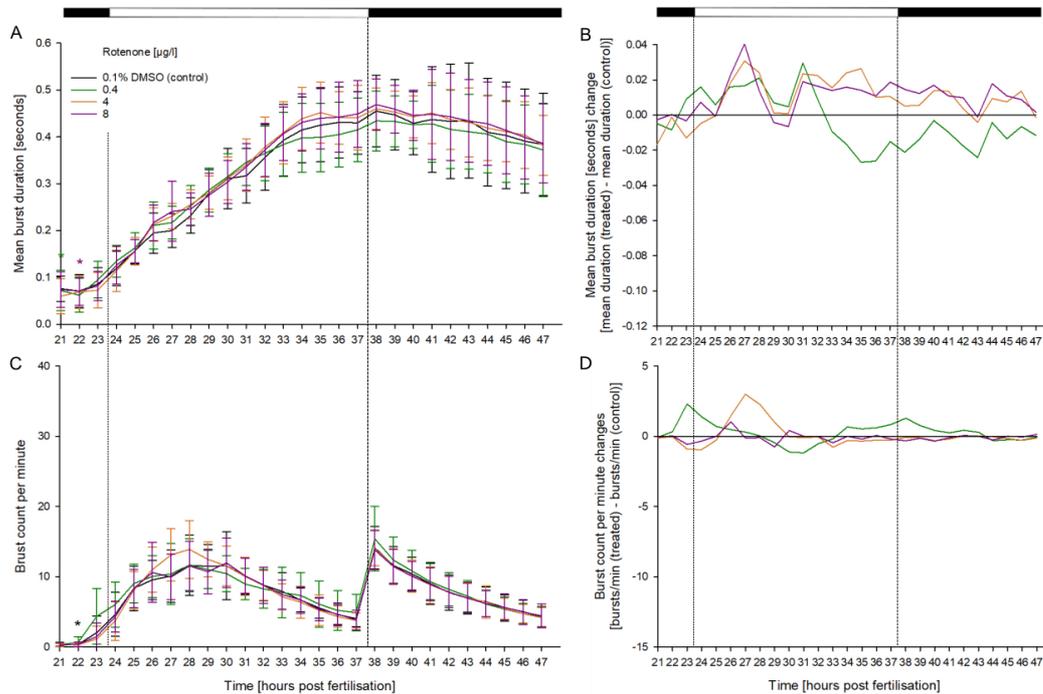


Abbildung 26. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Rotenon (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle,  $p$ -Werte sind in Annex IV, Tabelle 1 gelistet

Um zu beurteilen, ob es Verhaltensunterschiede gibt, welche nur auf der Aufzuchtbedingung der Embryonen beruhen, wurden die Kontrollgruppen der gruppierten und separierten Embryonen verglichen (Abbildung 28). Die Auswertung zeigt, dass die Aufzuchtbedingung sowohl den burst-count als auch die mean-burst-duration signifikant beeinflusste. Der burst-count der separierten Embryos war zunächst kürzer als es bei den gruppierten Embryonen der Fall war, bevor der burst-count nach 32 hpf signifikant länger wurde (Abbildung 28A). Der anfängliche burst-count-per-minute Peak, der normalerweise bei etwa 23 hpf beobachtet wird, fehlte bei den räumlich getrennten Embryonen, während sie auch zwischen 21 und 26 hpf signifikant geringere burst-count-per-minute Werte aufwiesen (Abbildung 28B). Beide Aufzuchtbedingungen folgten dann einem ähnlichen Verhaltensmuster und der zweite Aktivitätspeak bei 38 hpf war in beiden Gruppen vorhanden. Ab 38 hpf zeigten die getrennten Embryonen dann jedoch erhöhte burst-counts im Vergleich zu den gruppierten Embryonen. Insgesamt scheinen die Daten auf eine Verzögerung bei der Entwicklung des Coiling-Musters hinzuweisen. Da die separat gehaltenen Embryonen nicht die gleiche Hyperaktivität aufwiesen wie die gruppierten Embryonen, wird davon ausgegangen, dass die Grundaktivität der Zebrafisch-Embryonen während der frühen Ent-

wicklung durch viele Parameter beeinflusst wird, und dass die Reaktion auf ein Neurotoxins, zusammen mit der Ausprägung seiner Wirkung, stark durch den Kontakt zwischen den Embryonen beeinflusst wird.

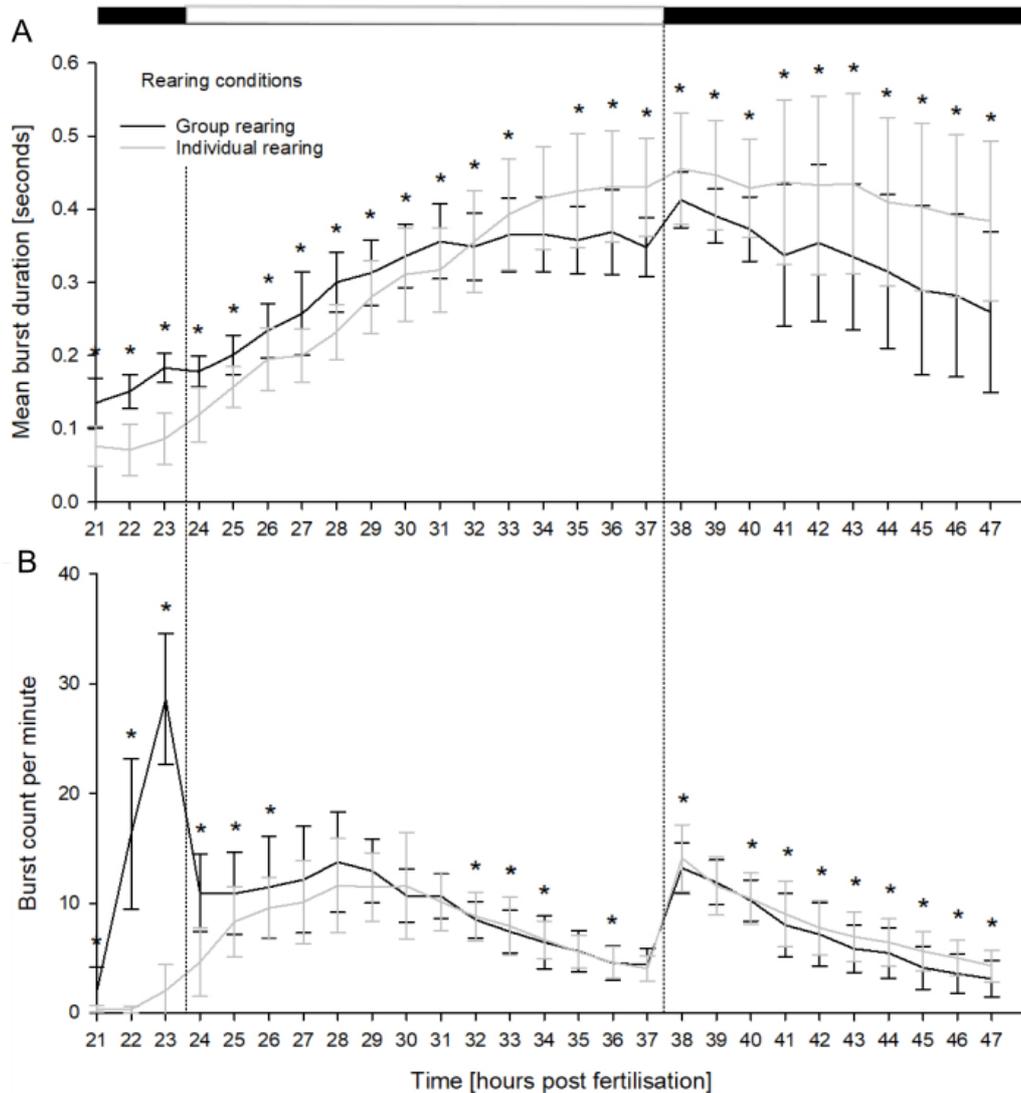


Abbildung 27. Der mean-burst-duration [seconds] (A) und burst-count-per-minute (C) zwischen 21 und 47 hpf von Zebrafisch-Embryonen in Gegenwart von 0,1% DMSO (n=3, 20 Embryonen/Replikate, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Schwarz: Gruppenaufzucht; grau: Einzelaufzucht. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt mit signifikantem Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Mann-Whitney U-Test). Eine Tabelle mit allen signifikanten  $p$ -Werten befindet sich in Annex IV, Tabelle 2

### 3.5.1 Worauf beruht die pränatale Kommunikation zwischen Zebrafisch-Embryonen?

Die wahrscheinlichsten Kommunikationswege wären im Zebrafisch-Embryo die visuelle Registrierung von Bewegungen, Veränderungen, die über das auditorische System erkannt werden, oder das Seitenlinienorgan, welches die Bewegungen im Wasser oder durch direkten Kontakt zwischen den Embryonen wahrnimmt. Bei 10 hpf beginnt sich das Auge des Zebrafischs zu entwickeln und ab 24 hpf kann das Auge einschließlich der beobachtbaren Mosaikanordnung der Photorezeptoren als solches identifiziert werden. Um

28 hpf differenzieren sich die ersten Zellen zu retinalen Ganglienzellen, den Ausgangsneuronen, die ihre Axone über den Sehnerv zu den Sehzentren des Gehirns senden (Morris und Fadool, 2005). Mit 72 hpf sind Auge und Linse vollständig ausgebildet und funktionsfähig (Glass und Dahm, 2004). Somit beginnt die Entwicklung des Auges etwa 10 Stunden vor der ersten Aufnahme des Coiling Assays, tatsächlich wird im Zeitraum des Coiling Assays die Auge-Hirn-Verbindung hergestellt. Studien haben jedoch gezeigt, dass die optokinetische Reaktion des Zebrafisches erst bei etwa 72 hpf auftritt, was mit dem Zeitpunkt des Schlupfes zusammenfällt. Außerdem ist das Auge des Zebrafisches erst ab 96 hpf so präzise wie bei adulten Fischen (Easter und Nicola, 1997). Andere Studien haben bewiesen, dass eine visuelle Schreckreaktion bereits ab 68 hpf induziert werden kann (Easter, Jr. und Nicola, 1996), verbunden mit dem Auftreten funktioneller Synapsen (Schmitt und Dowling, 1999). Die Hell-Dunkel-Wahrnehmung kann bereits kurz darauf gemessen werden (Morris und Fadool, 2005). Diese Befunde deuten darauf hin, dass sich das Auge zwar entwickelt und während der Zeitspanne des Coiling-Assays bereits funktionsfähig ist, es aber unwahrscheinlich ist, dass der in diesem Kapitel beschriebene Verhaltensunterschied von visuellen Hinweisen herrührt.

Für die Wahrnehmung auditiver Signale muss der Zebrafisch mehr als nur die voll ausgebildeten Makula-Kompartimente innerhalb der Otolithen besitzen (De Esch u. a., 2012). Während die Otolithen die Schwerkraft wahrnehmen, sind für das Hören weiterhin die Schwimmblase, die Weberischen Gehörknöchelchen und die perilymphatischen Räume notwendig (Popper und Fay, 1973). Studien haben gezeigt, dass die Entwicklung des Otolithen bei 16 hpf mit der Bildung der Ohrenanlage beginnt und bis 24 hpf auch zwei Haarzell-Sinnesmakeln entwickelt sind (Lu und Desmidt, 2013; Yao u. a., 2016). Studien ergaben, dass eine Woche alte Larven in der Lage sind, Audiogramme wahrzunehmen und darauf zu reagieren (Haddon und Lewis, 1996), während jüngere Zebrafische nur ein Fluchtverhalten (Zeddies und Fay, 2005) aber keine Hörfähigkeiten zeigten (Lu und Desmidt, 2013). In Anbetracht der Tatsache, dass die Schwimmblase erst bei 96 hpf voll entwickelt ist (Hernandez u. a., 2018), wird angenommen, dass die beobachtete Reaktion im Coiling-Assay nicht über das auditorische System des Zebrafisches-Embryos übertragen wird.

Schließlich benötigt der Zebrafisch für die mechanische/sensorische Kommunikation ein entwickeltes und funktionierendes Seitenlinienorgan. Die Plakode der Seitenlinie beginnt sich ab 18 hpf zu bilden (Thomas u. a., 2015), bis 48 hpf haben sich die beiden Neuronen, die sich zum Otolithen entwickeln, vollständig entwickelt und weitere Neuronen entstehen bereits (Ledent, 2002). Es wird vermutet, dass die frühe Bewegungsaktivität des Zebrafisches auf zufälligem Neuronalsignalen beruht (Kokel u. a., 2013). Darüber hinaus können ab 21 hpf Coiling-Reaktionen durch Kopfberührungen induziert werden, wobei Schwanzstimuli ab 27 hpf eine Reaktion hervorrufen (Saint-Amant und Drapeau, 1998). Diese Reiz-Reaktions-Entwicklung findet in der Zeit statt, in der der Coiling-Assay durchgeführt wird und könnte die höhere Häufigkeit von Bewegungen bei grup-

pierten Embryonen im Vergleich zu getrennten Individuen erklären. Die von einem Embryo initiierte Bewegung könnte durch das Expositionsmedium übertragen werden und andere Embryonen stimulieren, die daraufhin Muskelkontraktionen ausführen (Saint-Amant und Drapeau, 1998). Bei den gruppierten Individuen wurde außerdem beobachtet, dass die Embryonen häufig nahe genug beieinander lagen, um Chorion-zu-Chorion-Kontakt zu haben, was die Stärke der Übertragung durch Entfernen des dazwischenliegenden Mediums erhöhen würde. Bei anderen Spezies wurde festgestellt, dass sie Schlüpfenzyme absondern (Yamagami, 1981) oder zeitliche Vibrationsmuster (Warkentin u. a., 2006) als Hinweise zur Einleitung des synchronisierten Schlüpfens verwenden, was weiter unterstreicht, dass es bei anderen Spezies Modi der Kommunikation zwischen Embryonen gibt. Diese Befunde scheinen die Theorie zu stützen, dass die Seitenlinie ein Schlüsselfaktor für die Synchronität von Schlupf und frühen Bewegungsmustern der Embryonen ist.

In Anbetracht dieser Befunde sollte weiterhin berücksichtigt werden, dass die neurotoxischen Effekte von Rotenon nicht von den getrennten Individuen gezeigt wurden, die der gleichen Konzentration und unter ansonsten unveränderten Bedingungen ausgesetzt waren. Frühere Untersuchungen ergaben auch, dass gruppierte Zebrafische nach den ersten 5 Tagen der Entwicklung aktiver sind als getrennte Embryonen (Zellner u. a., 2011). Es wurde daraufhin beschrieben, dass die Aufzuchtbedingungen die Auswirkungen neuroaktiver Substanzen (Substanzen, die reversible Verhaltensänderungen induzieren; Ogungbemi et al., 2019) beeinflussen würden. Diese Hypothese wird auch durch die Erkenntnis gestützt, dass die Gruppenaufzucht bei anderen Spezies die Neuronenverknüpfung erleichtern kann (Lazic u. a., 2006), was eine weitere Erklärung für die insgesamt fehlenden Beobachtungen bei den hier vorgestellten separierten Embryonen liefern könnte. Da die Bedingungen des Versuchsaufbaus ansonsten zwischen den Aufzuchtbedingungen unverändert waren, wird es als unwahrscheinlich angesehen, dass Unterschiede in irgendwelchen abiotischen Faktoren die Verhaltensunterschiede verursachten. Das festigt die Hypothese weiter, dass die Kommunikation zwischen Zebrafisch-Embryonen vor dem Schlüpfen eine wichtige Rolle bei der frühen Verhaltensausprägung spielt und dass sie in dem hier vorgestellten Coiling-Assay gemessen werden kann.

## Kapitel 4. Die Ergebnisse der FET-Tests und zweier Verhaltens-Assays mit Neonicotinoiden und Nikotin

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Anwendbarkeit des FET-Tests und des Coiling-Assays auf entwicklungs- und reprotoxische (DART) Substanzen dargelegt. Der nächste Schritt für die Bestimmung der Sensitivität dieser Assays ist es nun, ihre Effizienz in Bezug auf bekannte Neurotoxine zu testen, welche bisher fast ausschließlich in anderen Testsystemen getestet wurde. Hierzu wurden Nikotin und ausgewählte Neonicotinoide verwendet. In Insekten binden Neonicotinoide an den Nikotin-Acetylcholin-Rezeptor (nAChRs), was zu veränderter Nervenregung, Lähmung und schließlich zum Tod führt (Tomizawa und Casida, 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass Neonicotinoide auch negative Auswirkungen auf bestäubende Insekten, Vögel und einige Säugetiere haben mit schwerwiegenden ökologischen Folgen (Tomizawa und Casida, 2005). In Studien, die die Wirkung von Neonicotinoiden auf aquatische Wirbeltiere untersuchten, wurden Störungen des Neurotransmittergleichgewichts (Zhang und Zhao, 2017) sowie akute und langfristige Auswirkungen auf die Neuroentwicklung und das Verhalten festgestellt (Crosby u. a., 2015). Durch die Spezifität der Substanzen wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Zebraquariembryo Verhaltensveränderungen bereits in Konzentrationen aufweisen würde, welche noch keine morphologischen Veränderungen hervorrufen. Des Weiteren wurde angenommen, dass Nikotin (ein bekanntes Neurotoxin) einen stärkeren Effekt in den Assays haben würde, während die Neonicotinoide ähnliche Effekte mit geringerer Schwere aufweisen würden. Hier wurden Acetamiprid, Clothianidin, Dinotefuran, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam als Testsubstanzen ausgewählt, mit Nikotin als Positivkontrolle. Die EC wurden mit dem FET-Test (OECD TG 236) ermittelt, gefolgt vom Coiling- und dem basalen Schwimmverhaltens-Assay. Die neuronalentwicklungstoxischen (DNT) Substanzen, sowie die Versuchsprotokolle sind in Kapitel 2 erläutert.

Tabelle 12. Testkonzentrationen von Nikotin und den Neonicotinoiden im FET-Test, Coiling Assay und basalem Schwimmverhaltens-Assay [mg/l]

<b>Substanzen</b>	<b>FET-Test</b>	<b>Coiling Assay</b>	<b>Basaler Schwimmverhaltens-Assay</b>
Acetamiprid	1.4 - 22.5	0.6 - 22.5	0.6 - 22.5
Clothianidin	1.6 - 25	-	-
Dinotefuran	1.3 - 20.2	-	-
Imidacloprid	1.6 - 25.6	0.6 - 25.6	-
Nikotin	1 - 16.2	0.2 - 4	0.2 - 4
Thiacloprid	1.6 - 25.3	0.6 - 25.3	-
Thiamethoxam	1.8 - 29.1	-	-

-: nicht getestet im jeweiligen Assay: Clothianidin, Dinotefuran und Thiamethoxam zeigten keine erhöhte Spontanbewegung bei 24 hpf im FET-Test, sie wurden nicht weiter im Coiling-Assay getestet; Acetamiprid wurde für den Basalschwimm-Assay als Proof of Concept ausgewählt

#### 4.1 Die Ergebnisse der Wasserprobenanalyse

Die Medium Analyse wurde sowohl mit frisch angesetzten Proben als auch mit Proben durchgeführt, die am Ende des 120-Stunden-Experiments (mit Medium Wechsel alle 24 Stunden), zu welchem Zeitpunkt die Organogenese weitgehend abgeschlossen ist (Kimmel u. a., 1995) gewonnen wurden. Die Ergebnisse der Analyse sind in Annex V, Tabelle 1 zu finden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gemessene Konzentration von Acetamiprid nach 120 h bei den beiden höchsten Konzentrationen 70% der Nominalkonzentration betrug, während sie in den niedrigeren Konzentrationen <35% betrug. Für Dinotefuran wurde ein ähnliches Verhalten festgestellt. Diese Diskrepanzen zwischen der tatsächlichen und der nominellen Konzentration wurden als akzeptabel angesehen, da beide dieser Substanzen unter Versuchsbedingungen mäßig schnell abgebaut werden (EC, 2014a; EPA, 2002a). Für Clothianidin wurden in allen Gruppen mindestens 97% weniger Substanz gemessen als in der Nominalkonzentration angegeben. Mit einer Photolyse Rate von 3,3 Stunden bei 25 °C wurde dies als genau angesehen (FAO, 2016). In der niedrigsten Nominalkonzentration betrug die tatsächliche Imidacloprid-Konzentration 60% weniger als erwartet und sank schrittweise auf 15% in der höchsten Expositionsgruppe. Dies wurde mit der Photolyse Rate von <1 Tag in Verbindung gebracht, die bei höherer Sauerstoffsättigung erhöht ist (EC, 2011). Die tatsächlichen Nikotinkonzentrationen betrugen nur 51% der höchsten Nominalkonzentration und sank auf 25% in der niedrigsten Behandlungsgruppe. Thiacloprid und Thiamethoxam wurden in einer höheren Konzentration gemessen als in der Nominalkonzentration angegeben, wofür keine Erklärung gefunden werden konnte.

Wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen können die Stabilität der getesteten Substanzen beeinträchtigen (Kozikowski u. a., 2003). Während Maßnahmen ergriffen wurden, um wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen der Stammlösung zu vermeiden, wurde die aufgetaute Lösung täglich gehandhabt, wobei die Temperaturschwankungen und variierenden Lichtbedingungen ausgesetzt waren. Darüber hinaus wurden die gesammelten Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur Lagerung bei -80 °C aufbewahrt, bevor sie auf Trockeneis versandt wurden, was durchgehend zu verschiedenen Temperaturänderungen führte.

#### 4.2 Die Auswirkung der Neonicotinoide auf die im FET-Test beobachteten Endpunkte

Während des gesamten FET-Tests wurde für keine der Substanzen im gewählten Testbereich (der durch das EU-ToxRisk-Projekt für die Vergleichbarkeit der Assays gewählt wurde) Mortalität beobachtet. Die EC<sub>50</sub> Werte lagen für alle getesteten Neonicotinoide außer Acetamiprid höher als die höchste Testkonzentration (Tabelle 13). Nur für Nikotin musste keiner der EC-Werte von ToxRat® extrapoliert werden, da sie innerhalb des getesteten Bereichs lagen.

Tabelle 13. Die mit ToxRat® berechneten EC<sub>10</sub> and EC<sub>50</sub> Mittelwerte für Nikotine und die Neonicotinoide [mg/l] (n=3)

Substanzen	96 hpf		120 hpf	
	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>
Acetamiprid	3.0	43.4	0.1	14.2
Clothianidin	N/A	N/A	8.3 *	126.5 *
Dinotefuran	N/A	N/A	16.3 *	2126.5 *
Imidacloprid	N/A	N/A	N/A	N/A
Nikotin	3.6	7.3	1.0	3.8
Thiacloprid	33.9 *	50671.0 *	0.8 #	88.8 #
Thiamethoxam	17.3	74.1	3.6	74.6

\*: Werte, die auf Basis eines Replikats berechnet wurden (keine beobachteten Effekte zum gegebenen Zeitpunkt in den verbleibenden Replikaten), #: Werte, die auf Basis von zwei Replikaten berechnet wurden (keine beobachteten Effekte zum gegebenen Zeitpunkt im verbleibenden Replikat), N/A: Werte konnten von ToxRat® nicht berechnet werden, da keine oder zu wenige Effekte zum gegebenen Zeitpunkt beobachtet wurden.

Für ein detaillierteres Verständnis der Endpunkte, die in jedem der FET-Tests beobachtet wurden, enthält Tabelle 14 eine umfangreiche Liste. Im FET-Test wurden keine letalen Endpunkte beobachtet. Lordose und Kyphose, wie in Kapitel 3 definiert, wurden im Falle von Nikotin in mehr als der Hälfte der mit 8,1 mg/l und bei allen mit 16,2 mg/l exponierten Embryonen nach dem Schlüpfen beobachtet. Andere subletale Beobachtungen beinhalteten Tremor und Kraniofazialdeformationen, sowie Perikardödeme. Während ein leichtes Klopfen der Well-Platten bei 120 hpf die Kontroll-Embryonen dazu veranlasste, zu den Well-Wänden zu schwimmen und dort zu bleiben, zeigten nikotinexponierte Individuen bei niedrigen Konzentrationen ein zunehmend erratisches Schwimmverhalten, welches bei 16,2 mg/l exponierten Embryonen nicht mehr zu beobachten war.

Keine der Neonicotinoide beeinflusste den Schlupferfolg stark und die Gesamthäufigkeit der beobachteten Effekte war häufig <50% pro Behandlungsgruppe. Dies führte dazu, dass keine EC-Werte berechnet werden konnten (in Tabelle 13 mit "N/A" gekennzeichnet). Die Acetamiprid-Exposition führte zu einer leichten Erhöhung der Spontanbewegung bei 24 hpf, gefolgt von Kreislaufstörungen und Blutpooling ab 48 hpf, sowie einer erhöhten Aktivität bei 120 hpf (Tabelle 14). Die Clothianidin-Exposition induzierte keine Effekte bei 24 hpf, aber zwischen 48 und 72 hpf wurde verminderte Pigmentierung festgestellt, zusammen mit reduziertem Schlupferfolg und Blutkreislauf. Bis 96 hpf wurden nur milde Veränderungen des Blutkreislaufs beobachtet, zusammen mit einer Wirbelsäulendeformation, und bis 120 hpf zeigten nur die Behandlungsgruppen mit 12,5 und 25 mg/l gesteigerte Aktivität. Die Exposition mit Dinotefuran induzierte bei 120 hpf einen ähnlichen Trend wie Clothianidin ebenso wie eine erhöhte Spontanbewegung und verminderte Pigmentierung sowie eine Deformation der Wirbelsäule und ein verzögertes Schlüpfen in früheren Entwicklungsstadien. Die Exposition mit Imidacloprid induzierte nur bis 72 hpf Effekte, einschließlich erhöhter Spontanbewegung, Kreislauf-Reduktion und reduzierter Pigmentierung sowie Spinaldeformation. Thiacloprid-exponierte Embryonen zeigten eine Zunahme der Spontanbewegung und der Spätaktivität und ein leichteres Aufschrecken. Die einzigen

anderen beobachteten Endpunkte waren reduzierte Pigmentierung und reduzierter Herzschlag. Thiamethoxam-exponierte Embryonen zeigten eine erhöhte Spontanbewegung, gefolgt von reduziertem Kreislauf und Pigmentierung, reduziertem Schlüpfen und Wirbelsäulendeformation sowie erhöhter Aktivität zwischen 96 und 120 hpf.

Tabelle 14. Endpunkte in den FET-Tests mit Neonicotinoide

Endpunkt	Entwicklungs-Zeitpunkt				
	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
Spontanbewegung (-, =)	A, D, I, N, TC, TM				
Spontanbewegung (+)	N				
Verringertes Schlüpfen			A, C, D, I, N, TC, TM	N, TM	
Herzschlag (-, =, x)		A, I, TM		A	N
Blutkreislauf (-, =, x)		A, I, TM		C	N
Spinaldeformation (K, L)			A, C, D, I, N, TM	A, C, N, TM	A, N
Körperlänge (-, =)			I, N	A, N	A, N
Ödeme		I	N	A, N	N
Otolithendeformation					N
Pigmentierung (-, =, x)		A, C, D, I, N, TC, TM	A, C, D, I, N, TC, TM	A, N	
Vergrößertes Perikard		A	A	A	
Kraniofazialdeformation			N	A, N	A, N
Verringerte Dotter-Resorption				N	N
Tremor					N
Hyperaktivität				TC, TM	A, C, D, N, TC, TM

A: Acetamidprid; C: Clothianidin; D: Dinotefuran; I: Imidacloprid; N: Nikotin; TC: Thiachloprid; TM: Thiamethoxam; -: reduziert; =: stark reduziert; x: nichtmehr vorhanden; +: vermehrt, K: Kyphose; L: Lordose; Grau: Zeitpunkte an denen bestimmte Endpunkte nicht gemessen werden können

#### 4.3 Die Auswirkungen der Neonicotinoide auf das Coiling-Verhalten

Alle signifikanten *p*-Werte für die folgenden Coiling-Assays finden Sie in Annex V, Tabelle 2. Die Nikotin-Exposition verzögerte den Beginn des Coilings, mit einer konzentrationsabhängigen Abnahme der mean-burst-duration (Abbildung 28A). Vor 37 hpf induzierten alle außer der niedrigsten Expositions-Konzentration signifikante Veränderungen, aber nach dem Beginn der zweiten Dunkelphase (37,5 hpf) zeigte sich eine signifikante Abnahme. Betrachtet man die normalisierte Darstellung, so zeigt sich eine deutlich konzentrationsabhängige Abnahme, während das Gesamtmuster des Parameters unbeeinflusst bleibt (Abbildung 28B). Die mean-burst-count-per-minute wurde ebenfalls durch die Nikotin-Exposition beeinträchtigt, wobei die höchste Expositions-konzentration (4 mg/l) einen sofortigen Mangel an Aktivität induzierte (Abbildung 28C). Die übrigen Expositions-konzentrationen induzierten eine konzentrationsabhängige Verzögerung des ersten Peaks um bis zu 7 Stunden, während sie auch den zweiten Peak um 37 hpf erhöhten (Abbildung 28C).

Die normalisierten Daten verdeutlichen dies weiter, wobei nur 4 mg/l eine kontinuierliche Reduktion der Aktivität verursacht, während die übrigen Behandlungsgruppen eine verringerte Aktivität zu Beginn, gefolgt von einem Anstieg, zeigen (Abbildung 28D).

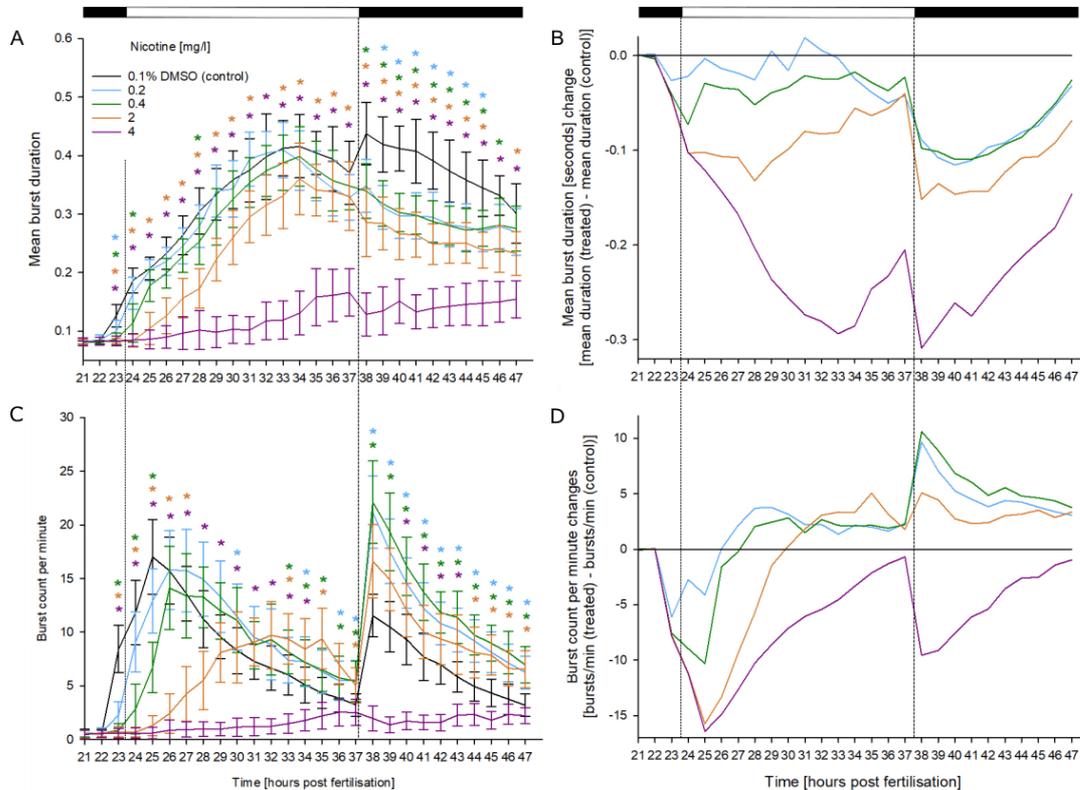


Abbildung 28. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Nikotin (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle

Bei Thiacloprid-exponierten Zebrafisch-Embryonen wurde nur die mean-burst-duration in einer konzentrationsabhängigen Weise in späteren Stadien des Assays als signifikant reduziert gemessen (Abbildung 29A). Die normalisierte Darstellung der Daten verdeutlicht weiter die konzentrationsabhängige Wirkung von Thiacloprid, da die Exposition mit  $<25,3$  mg/l eine kurzfristige Hyperaktivität um 30 hpf induzierte (Abbildung 29B). Eine umgekehrte konzentrationsabhängige Hyperaktivität nach 26 hpf wurde für die Bewertung der burst-count-per-minute beobachtet, obwohl dies nicht von statistischer Signifikanz war (Abbildung 29C, D).

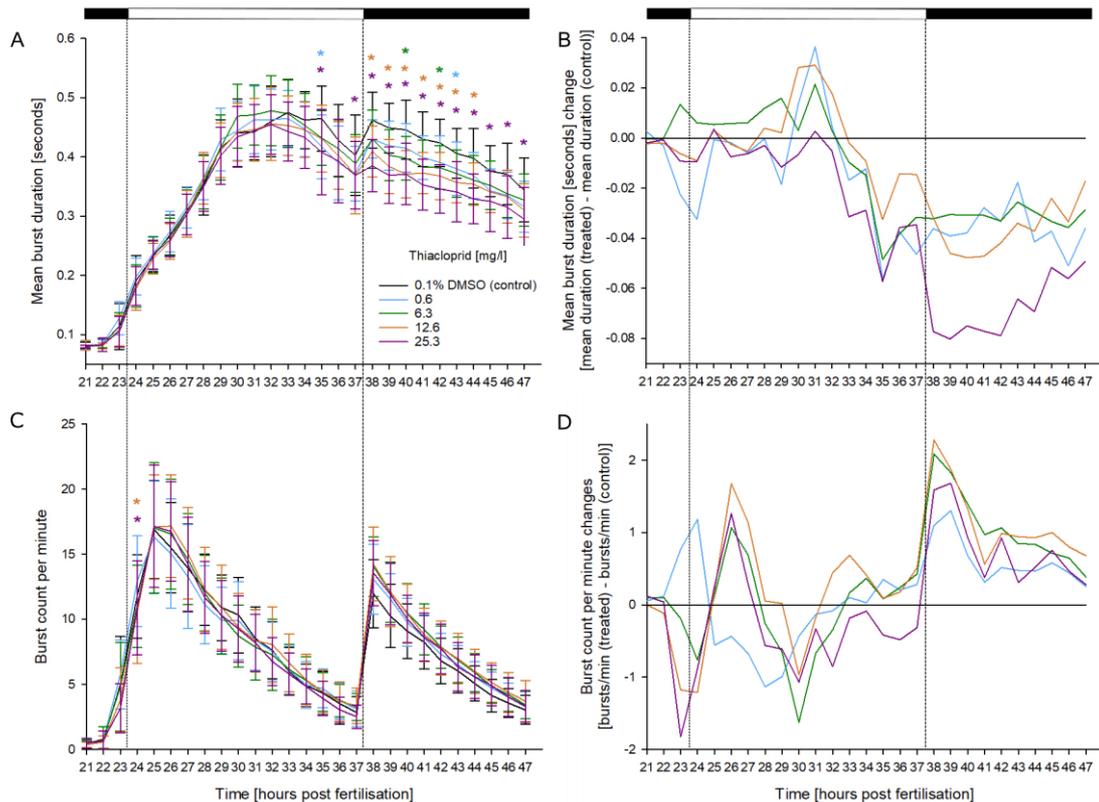


Abbildung 29. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Thiachloprid (n=3, 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle

Die Exposition mit 22,5 mg/l Acetamiprid induzierte eine signifikante Reduktion der frühen mean-burst-duration, was auf eine milde Reaktion auf den ersten Wechsel im Lichtzyklus hinweist (Abbildung 30A). Darüber hinaus wurde in dem bis 47 hpf durchgeführten Replikat eine konzentrationsabhängige Reduktion der burst-duration mit dem Beginn der zweiten Dunkelphase beobachtet. Die durch Acetamiprid induzierte Hyperaktivität sowie die nachfolgende Hypoaktivität sind in der normalisierten Darstellung der Daten deutlicher zu beobachten (Abbildung 30B). Der Effekt der Acetamiprid-Exposition auf die burst-count-per-minute zeigte in den frühen Stadien die gleiche Signifikanz (Abbildung 30C, D). Außerdem induzierte die Exposition mit 5,6 und 11 mg/l ab 38 hpf Hyperaktivität. Während der frühen Entwicklung beeinflusste die Imidacloprid-Exposition signifikant die burst-duration während der Hell-Phasen und verursachte eine konzentrationsabhängige Abnahme des späten Coiling-Verhaltens (Abbildung 31A, B). Die burst-count-per-minute (Abbildung 31C) wurde durch die Imidacloprid-Exposition weniger beeinflusst, aber Individuen zeigten eine reduzierte Reaktion auf den ersten Licht-Wechsel bei 24 hpf. Dies ist in den normalisierten Daten (Abbildung 31D) ebenso deutlicher sichtbar wie die folgende Hyperaktivität.

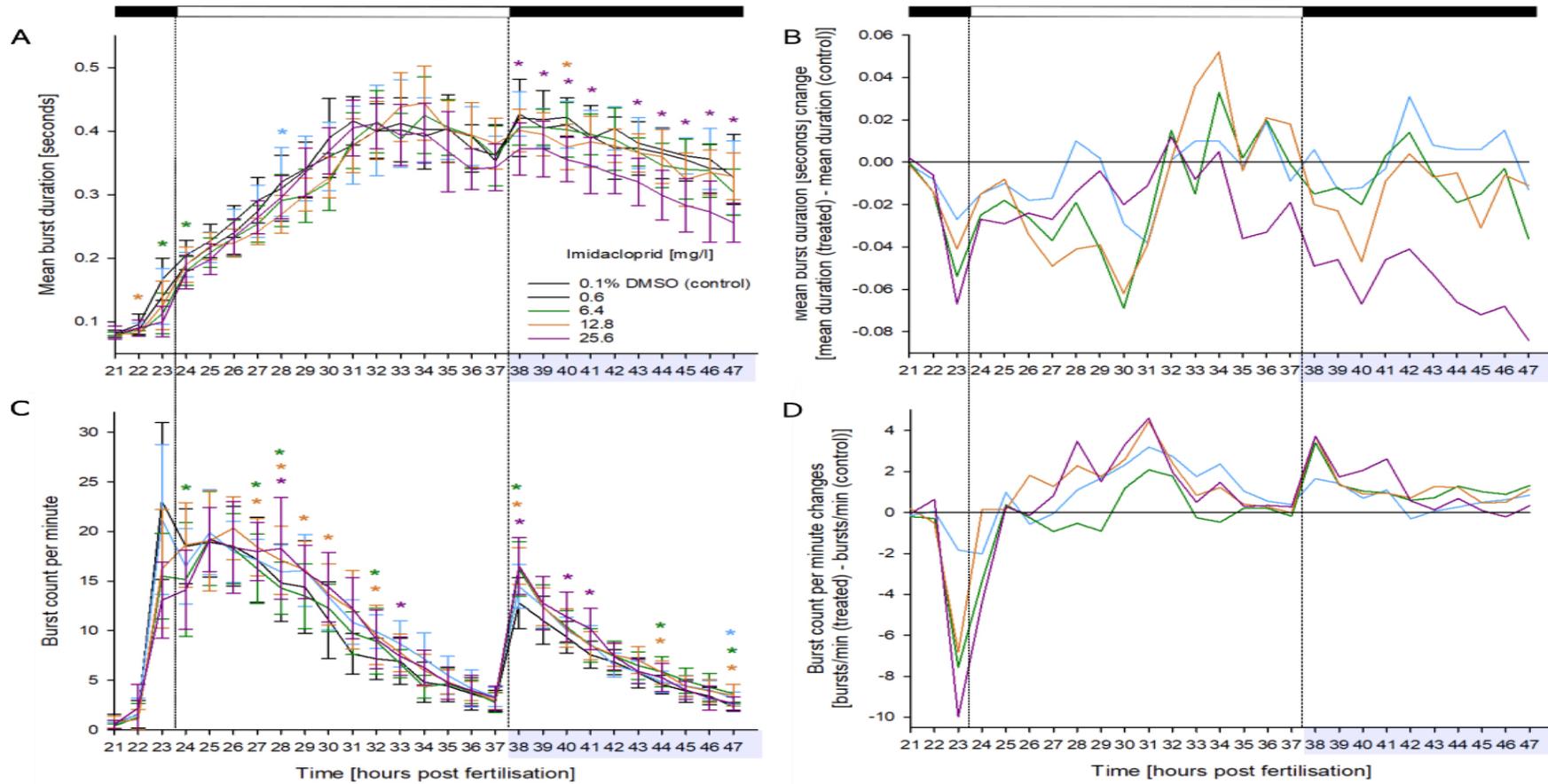


Abbildung 30. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Acetamiprid ( $n=4$  (21-37 hpf)  $n=1$  (38-47 hpf; Blau hinterlegt), 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle

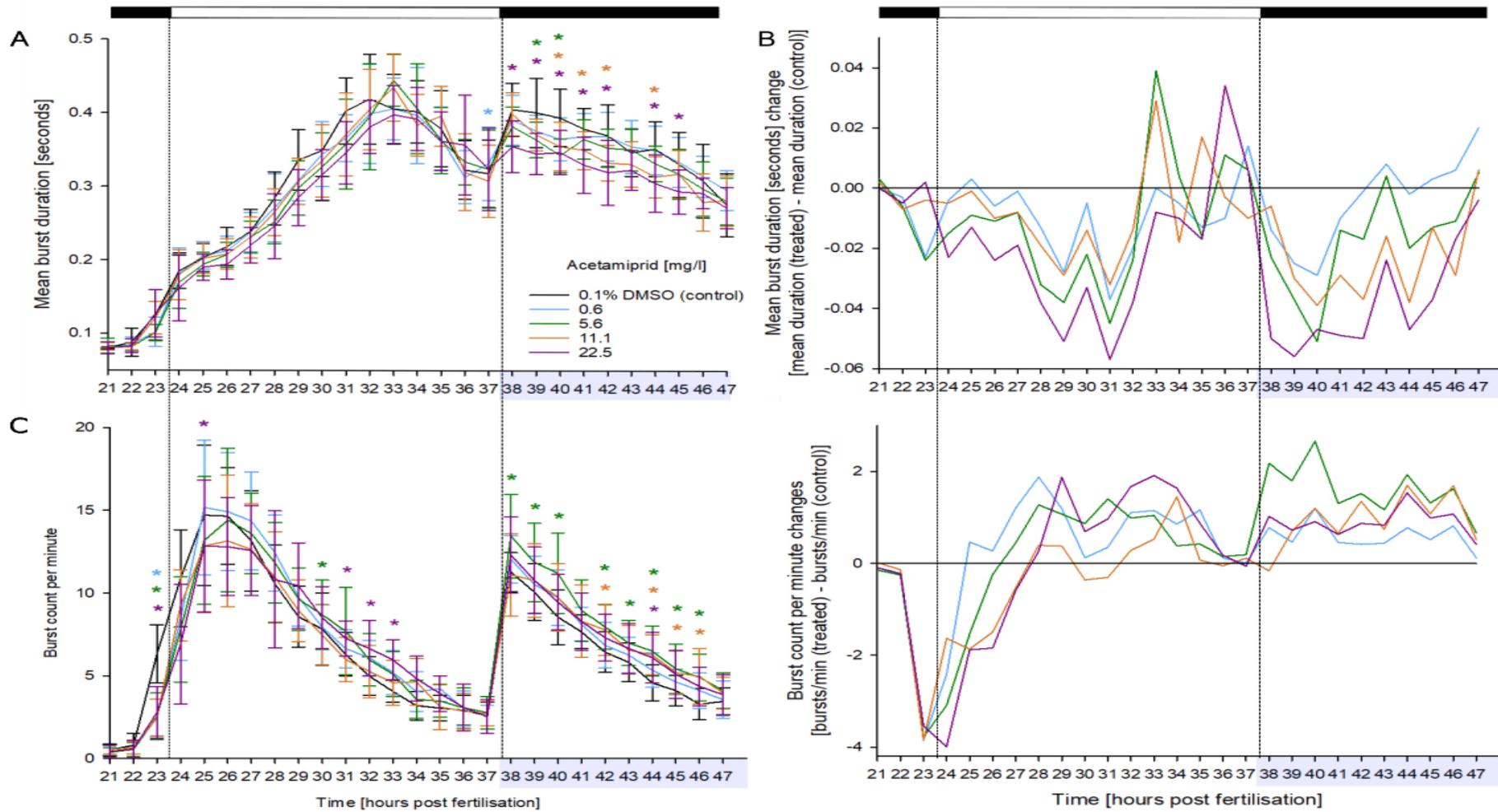


Abbildung 31. Mean-burst-duration (A), normalisierte burst-duration (B), burst-count-per-minute (C), und normalisierte burst-count (D) zwischen 21 und 47 hpf in Gegenwart von Imidacloprid (n=4 (21-37 hpf) n=1 (38-47 hpf; Blau hinterlegt), 20 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: angepasst an die Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle

Wie bereits in Kapitel 3 wurde auch hier der Einfluss der Lichtzyklen auf das Verhalten der Embryonen durch die Schwellenwerte beurteilt. Die Nikotin-Exposition induzierte in allen Expositionsgruppen eine Reduktion der burst-duration unterhalb des  $SC_{10}$  (Abbildung 32A), während der burst-count-per-minute noch stärker beeinflusst wurde (Abbildung 32B). Dabei induzierten Konzentrationen  $\leq 2$  mg/l Nikotin eine erhöhte Aktivität und die höchste Nikotinkonzentration eine Hyperaktivität bis über den  $SC_{50}$ . Die Thiaclopid-Exposition induzierte eine leichte Reduktion der burst-duration (Abbildung 32C), während sie bei Individuen, die mit  $> 0,4$  mg/l exponiert waren, zu einer Reaktion  $>SC_{10}$  führte (Abbildung 32D).

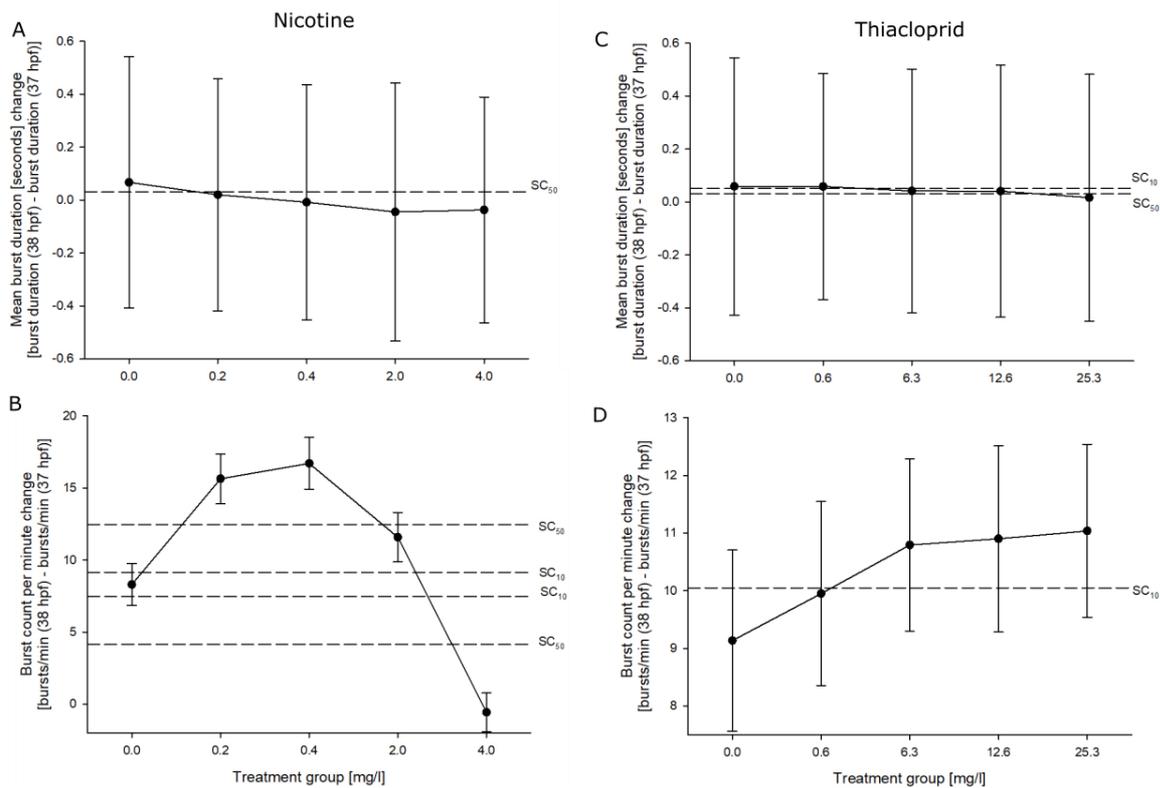


Abbildung 32. Mean-burst-duration [seconds] (A, C) und burst-count-per-minute (B, D) von 37 zu 38 hpf in Gegenwart von Nikotin (A, B) und Thiaclopid (C, D) ( $n=3$ , 20 Embryonen/Konzentration). Die Daten sind die Differenz zwischen den beiden Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung.  $SC_{10}$  und  $SC_{50}$ : 10 und 50% Abweichung der Werte von der Kontrollgruppe

Es wurde weiterhin festgestellt, dass die mean-burst-duration von Acetamidrid und Imidaclopid-exponierten Embryonen während des Lichtwechsels bei 37,5 hpf nicht beeinflusst wurde (Abbildung 33A und C). Allerdings induzierte die Acetamidrid-Exposition einen Anstieg der Coiling-Frequenz, der den  $SC_{10}$ -Schwellenwert nur bei 5,6 und 22,5 mg/l exponierten Embryonen überschritt (Abbildung 33B). Ein noch deutlicherer Trend kann für die Imidaclopid-exponierten Organismen beobachtet werden, wobei alle Expositions-Gruppen eine erhöhte burst-count-per-minute zeigten (Abbildung 33D), die den  $SC_{10}$  überstieg.

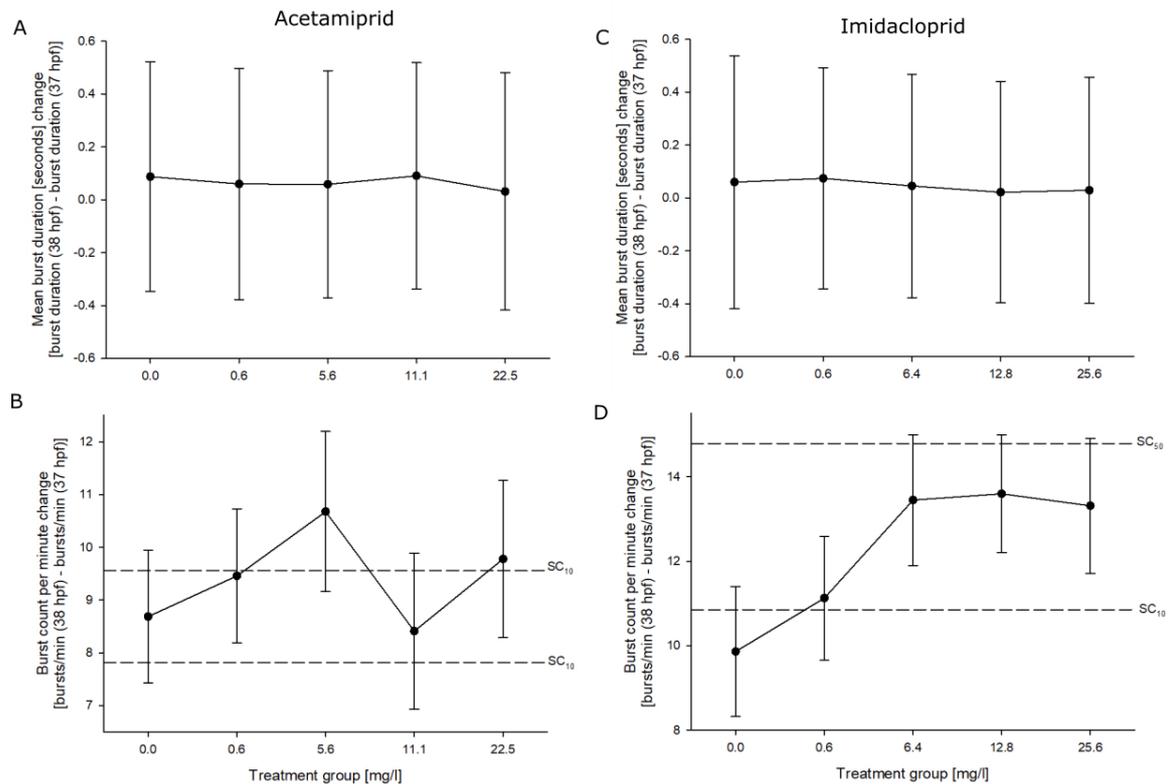


Abbildung 33. Mean-burst-duration [seconds] (A, C) und burst-count-per-minute (B, D) von 37 zu 38 hpf in Gegenwart von Acetamiprid (A, B) und Imidacloprid (C, D) (n=1, 20 Embryonen/Konzentration). Die Daten sind die Differenz zwischen den beiden Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung. SC<sub>10</sub> und SC<sub>50</sub>: 10 und 50% Abweichung der Werte von der Kontrollgruppe

#### 4.4 Die Auswirkung der Neonicotinoide auf das Schwimmverhalten

In den späten Stadien der zweiten Lichtphase und mit dem Beginn der zweiten Dunkelphase induzierte die Exposition mit  $\geq 11,1$  mg/l Acetamiprid eine Reduktion der Distanz im Vergleich zu den Kontroll-Embryonen, was eine Fortsetzung des beobachteten Trends war. Individuen, die mit niedrigeren Konzentrationen exponiert wurden, zeigten anfangs eine leicht erhöhte Bewegungsdistanz, wobei nur die mit 0,6 mg/l exponierten Embryonen diesen Trend fortsetzten (Abbildung 34B). Dies wurde auch bei der Gesamthäufigkeit der Bewegung beobachtet, wo die Exposition mit  $\geq 11,1$  mg/l Acetamiprid die Aktivität reduzierte, während  $\leq 2$  mg/l exponierte Embryonen ähnliche Aktivitätswerte wie die Kontrollen zeigten (Abbildung 34D). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Schwimmdistanz oder -frequenz der mit Nikotin exponierten Zebrafisch-Embryonen beobachtet (Abbildung 35A, C). Die normalisierte Darstellung der Daten zeigt jedoch, dass die insgesamt zurückgelegte Distanz im Vergleich zur Kontrollgruppe in einer konzentrationsabhängigen Weise erhöht war (Abbildung 35B). Darüber hinaus induzierte die Exposition mit 0,2 mg/l Nikotin zunächst eine Reduktion der Distanz, gefolgt von einem Aktivitätspeak und einer weiteren Reduktion. Die Bewegungsfrequenz der nikotinexponierten Embryonen war zunächst in allen Behandlungsgruppen reduziert, gefolgt von einer Normalisierung auf die Frequenz der Kontrollgruppe (Abbildung 35D).

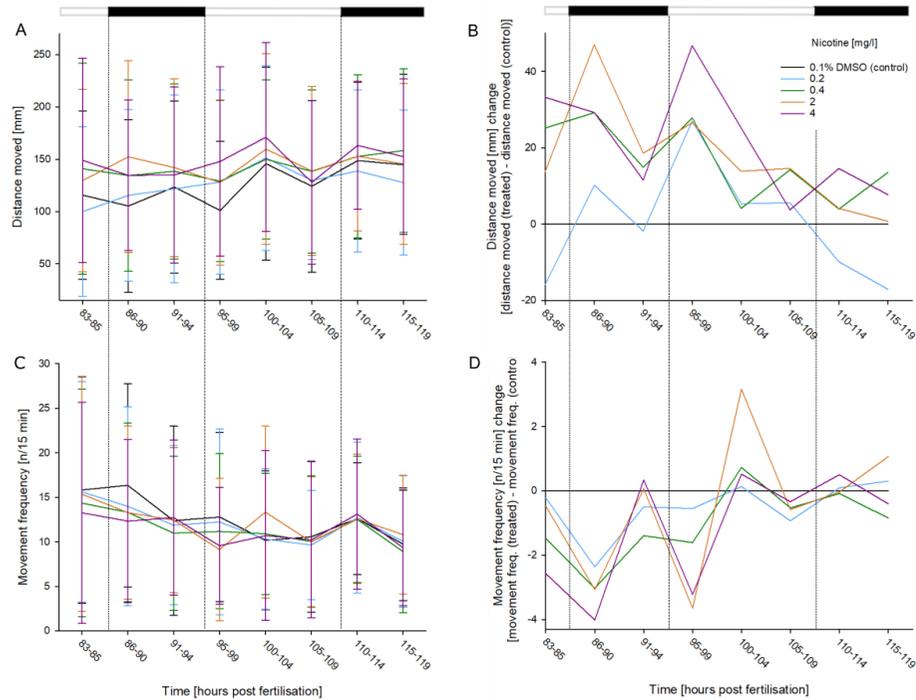


Abbildung 35. Die gruppierte zurückgelegte Gesamtdistanz [mm] (A), normalisierte Distanz (B), gruppierte Bewegungsfrequenz [n/15min] (C), und normalisierte Frequenz (D) zwischen 83 und 120 hpf in der Gegenwart von Nikotin ( $n=3$ , 19 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: Normalisiert zur Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle

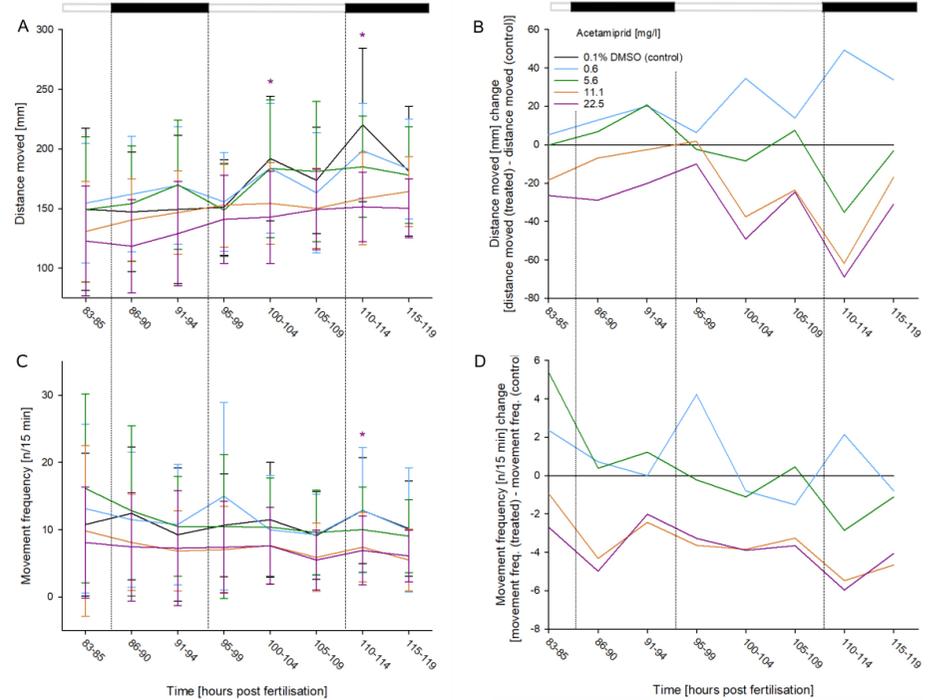


Abbildung 34. Die gruppierte zurückgelegte Gesamtdistanz [mm] (A), normalisierte Distanz (B), gruppierte Bewegungsfrequenz [n/15min] (C), und normalisierte Frequenz (D) zwischen 83 und 120 hpf in der Gegenwart von Acetamiprid ( $n=2$ , 19 Embryonen/Konzentration/Replikat). A und C: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. B und D: Normalisiert zur Kontrolle. Balken: Lichtzyklus. \*: Zeitpunkt und Konzentration des signifikanten Unterschieds zur Kontrolle, alle p-Werte sind in Annex V, Tabelle 3

#### 4.5 Der Vergleich der Neonicotinoid-Auswirkungen auf den Zebraärblings-Embryo mit den Reaktionen in anderen Säugetiermodellen

Während die Bestimmung von (D)NT im Zebraärbling bereits in ökotoxikologischen Studien Anwendung gefunden hat (z. B. (e.g., Bambino and Chu, 2017; Galloway et al., 2017), beginnt sich ihre Verwendung in der Risikobewertung für den Menschen erst jetzt abzuzeichnen. Die Verwendung von Verhaltensendpunkten als Messgröße für potenzielle neurologische Effekte hat sich weitgehend durchgesetzt, da sie z. B. die Bestimmung funktionseller Folgen von Zellschäden für ein Individuum unterstützt (Vorhees u. a., 2021). Alle Publikationen zu den in den folgenden Abschnitten diskutierten Säugetierdaten wurden in Annex V, Tabelle 4 zusammengefasst einschließlich der experimentellen Verfahren, Dosierungsbereiche und aller beobachteten Endpunkte.

Die hier vorgestellten FET-Testdaten verdeutlichen das Auftreten einiger entwicklungsbedingter Veränderungen einschließlich der Wirbelsäulendeformationen, eines vergrößerten Perikard Bereichs und Kraniofazialdeformationen aufgrund der **Nikotin**-Exposition. Frühere Untersuchungen mit jungen Zebraärblingen ergaben, dass eine 10-tägige Exposition ebenfalls eine Verformung der Wirbelsäule induzierte und die Gesamtkörperlänge reduzierte (Parker und Connaughton, 2007). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es eine starke Korrelation zwischen spinalen Motoneuronen und der Somitenentwicklung gibt (Wilt und Hake, 2003) und dass Substanzen, die das Pathfinding der Neuronen beeinflussen, somit auch die Muskelbildung beeinflussen können (Svoboda u. a., 2002). Dies wurde durch eine Studie mit Ratten gestützt, die zeigte, dass eine pränatale Exposition das Körper- und Hirngewicht der Jungtiere reduzierte und z. B. die kortikale Dicke, die Zellgröße und die neuronale Dichte beeinflusste (Roy und Sabherwal, 1994). Außerdem wurde festgestellt, dass eine chronische Nikotinexposition die Knochenbildung beeinträchtigt und die biomechanischen Eigenschaften bei erwachsenen Kaninchen reduzierte (Silcox u. a., 1995). Frühere auf Zebraärblingen basierende Studien ermittelten zudem kardiovaskuläre Effekte (Yoo u. a., 2018), und brachten Herzdeformationen, Ödeme und verminderte Durchblutung mit dem verzögerten Übergang von Stammzellen durch das Mesoderm in Verbindung (Palpant u. a., 2015). Herzveränderungen werden seit langem mit pränataler Nikotinexposition bei Menschen (Maturri u. a., 2000), Ratten und Schafen (Feng u. a., 2010) in Verbindung gebracht. Der Tremor und die Kraniofazialdeformationen, die in diesem Kapitel beobachtet wurden, können mit der Wirkung der Substanz auf nAChRs in Verbindung gebracht werden, die bereits während der Embryogenese vorhanden und für die frühe Entwicklung der Neuralplatten entscheidend sind (Svoboda u. a., 2002). Darüber hinaus wurde in DART-Tests das Auftreten von Gaumenspalten bei Nachkommen von Mäusen beobachtet, die während der Trächtigkeit dosiert wurden (National Research Council, 1977), was mit der Kraniofazialdeformation bei Zebraärblings-Embryonen verglichen werden kann. Zuvor wurde auch festgestellt, dass Nikotin eine konzentrationsabhängige Verhaltensänderung bei Zebraärblings-Embryonen induziert (Ogungbemi et al., 2019), was die Ergebnisse des hier vorgestellten Coiling-Assays unterstützt. In beiden Studien wurden bei Individuen, die hohen Nikotinkonzentrationen ausgesetzt waren, läh-

mungsähnliche Symptome festgestellt, die wahrscheinlich durch die Aktivierung und anschließende Desensibilisierung von muskelspezifischen nAChRs verursacht wurden (Svoboda u. a., 2002). In einem Assay zum veränderten Coiling-Verhalten wurde festgestellt, dass die Wirkung von Nikotin auf zuvor nicht exponierte Zebrabärblings-Embryonen im Alter von 25 hpf eine Minute nach Beginn der Exposition eine akute Hyperaktivität auslöst (Menelaou u. a., 2014; Thomas u. a., 2009), und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass erhöhte Nikotinkonzentrationen zu Muskeldegeneration führen (Leonard und Salpeter, 1979). Darüber hinaus wurde in einer Säugetierstudie festgestellt, dass nikotinexponierte Ratten- und Kaninchenembryonen eine verminderte Aktivität zeigten zusammen mit einer verzögerten Entwicklung und Veränderungen verschiedener biochemischer Parameter (Kennedy, 2012), was hier als äquivalent zur niedrig dosierten Exposition von Embryonen angesehen werden kann. Bei der Untersuchung der Schwimmaktivität von Zebrabärblingen zeigten Crosby et al. (2015), dass >6,5 mg/l Nikotin die Aktivität unter dunklen Bedingungen bei 144 hpf signifikant reduzierte. In einer anderen Studie wurde jedoch eine erhöhte Schwimmaktivität nach Exposition mit >97,3 mg/l Nikotin gezeigt, was mit den  $\alpha 7$ - und  $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs in Verbindung gebracht wird, die eine wichtige Rolle bei anxiolytischen Reaktionen spielen (Bencan und Levin, 2008) und auch für die Gehirnentwicklung von zentraler Bedeutung sind (Papke u. a., 2012). So interagiert Nikotin direkt mit dem zentralen Nervensystem, indem es die Motoneuron-Axonbahn verändert (Welsh u. a., 2009). Es wurde auch festgestellt, dass junge Zebrabärblinge nach niedrig dosierter Exposition eine erhöhte Schreckreaktion hatten, während die Exposition gegenüber höheren Dosen im Laufe der Zeit zu einer Desensibilisierung gegenüber Reizen führte. Bei niedrig dosierten nikotinexponierten Mäusen wurde eine erhöhte Aktivität bei niedrigen Konzentrationen festgestellt, aber mit zunehmender Konzentration nimmt die zurückgelegte Strecke und das Aufbäumen (d. h. Mäuse, die auf ihren Hinterbeinen stehen) ab. Auch hier wurde eine Beeinflussung der Neurotransmitterfreisetzung durch die Exposition festgestellt (Freeman u. a., 1987). Diese Befunde stützen die Aussage, dass der Zebrabärblings-Embryo und die Säugetiermodelle eine Hyperaktivität auf niedrig dosierte Nikotinexposition zeigen und mit zunehmender Konzentration eine Abnahme der artspezifischen Verhaltensweisen induzieren.

In dem vorliegenden, mit **Acetamiprid** durchgeführten FET-Test, wurden in den frühen Stadien nur wenige und in den späteren Stadien überhaupt keine Effekte beobachtet. Eine Hypothese zu dieser Beobachtung ist, dass das Chorion den Großteil der Substanz daran hindert, weiter einzudringen, wodurch der Kontakt zum Embryo effektiv verhindert wird (Osterauer und Köhler, 2008; Vignet u. a., 2019). Das Schlüpfen würde die direkte Exposition erleichtern, was zu einer höheren Substanzbelastung im Organismus führt. Frühere Untersuchungen errechneten einen 120 hpf LC<sub>50</sub>-Wert >445,3 mg/l und beobachteten Effekte wie schwere Missbildungen der Wirbelsäule und der Schwimmblase sowie Ödeme (Ma u. a., 2019). In einer Reproduktionsstudie mit Ratten wurde festgestellt, dass die Verabreichung von bis zu 800 ppm Acetamiprid das Gewichtsverhältnis von Thymus zu Gehirn bei weiblichen Jungtieren verringerte (Anonymous, 1999). In einem pränatalen Experiment an Mäusen mit wiederholter Dosis wurde außerdem festgestellt, dass eine Aceta-

miprid-Exposition eine Hypoplasie der Kortikalis und eine verringerte Neurogenese hervorruft, während eine postnatale Exposition zu einer abnormalen neuronalen Verteilung führt (Kagawa und Nagao, 2018). Darüber hinaus wurde in Mausstudien eine Reduktion der nAChR-Expression im Riechkolben und im Mittelhirn festgestellt (Terayama u. a., 2016), während die Exposition von isolierten Mausembryonen die normale Embryonalentwicklung hemmte, indem sie z. B. die Blastozystenanzahl beeinflusste (Babel'ová u. a., 2017). Insgesamt unterstützen die hier beobachteten Effekte die zuvor beobachteten Endpunkte. Ähnlich wie beim vorliegenden Coiling Assay wurde in einer früheren Studie festgestellt, dass Acetamiprid eine konzentrationsabhängige Abnahme der frühen "Anzahl der Bewegungen/min" und eine Verzögerung der Entwicklung hervorruft, wobei ein vollständiges Fehlen der Reaktion bei 980 mg/l behandelten Zebrabärblingen auftrat. Zusätzlich war die Berührungsreaktion zwischen 27 und 36 hpf in >534,4 mg/l behandelten Individuen signifikant reduziert (Ma u. a., 2019). Obwohl der Konzentrationsbereich der Acetamiprid-Exposition hier unter denen von Ma u. a. (2019) verwendeten liegt, ist es bemerkenswert, dass in ihrer Studie ähnliche, wenn auch stärkere Verhaltensveränderungen beobachtet wurden und, dass die Reaktion auf Lichtveränderungen hier eine signifikante Veränderung der burst-count-per-minute hervorrief. Es konnten keine Studien gefunden werden, in denen die Wirkung von Acetamiprid auf das Frühverhalten bei Säugetier-Modellen untersucht wurde. Darüber hinaus zeigt der hier vorgestellte Schwimmverhaltens Assay, dass eine Acetamiprid-Exposition die Schwimmdistanz und -häufigkeit im Vergleich zu Basalbedingungen reduziert. In einer Verhaltensstudie wurde festgestellt, dass männliche Mäusejungtiere, die mit Acetamiprid exponiert wurden, reduzierte Angstzustände zeigten, während niedrig dosierte Männchen auch ein erhöhtes sexuelles und aggressives Verhalten zeigten (Sano u. a., 2016). Tremor wurde außerdem als mögliche unerwünschte Wirkung bei erwachsenen Mäusen beobachtet (Anonymous, 1992) und wurde in einer anderen Säugetierstudie festgestellt, in der auch Gangveränderungen und eine reduzierte allgemeine Bewegungsaktivität beobachtet wurden (Anonymous, 1997). Die reduzierte Bewegungshäufigkeit und -distanz in dem in diesem Unterkapitel vorgestellten Schwimmversuch sind daher wahrscheinlich repräsentativ für die reduzierte Aktivität.

**Imidacloprid** induzierte im FET-Test nur bis 72 hpf Effekte und ließ die Berechnung von EC-Werten nicht zu. Dies folgte früheren Erkenntnissen, da die 96 hpf LC<sub>50</sub> in früheren Studien mit 121,4 bis 143,7 mg/l determiniert wurde (Yanhua Wang u. a., 2017; Wu u. a., 2018). Andere Studien fanden keine Mortalität bei einer Exposition von <2 g/l und beobachteten überhaupt keine schädlichen Auswirkungen bei exponierten Individuen (Vignet u. a., 2019). Die Studie stellte außerdem fest, dass 120 Stunden alte Zebrabärblinge nur etwa 15% des Imidacloprid im Expositionsmedium biologisch aufnehmen konnten und das Chorion als Barriere während der Expositionsphase vor dem Schlüpfen fungierte. Die einzige Teratogenitätsstudie, die mit einem Säugetier-Testsystem durchgeführt wurde, ergab, dass Küken Embryonen nach der Exposition während der frühen Entwicklung Fehlbildungen des Herzens aufwiesen (Gao u. a., 2016). Da die Vergrößerung des Herzens ein beobachteter Endpunkt während der frühen Entwicklungsstadien war, unterstützt diese Überschneidung der beobachteten Wirkung die Ergebnisse und die Empfindlichkeit der FET-Tests. Im Coiling Assay induzierte 25,5 mg/l Imidacloprid eine späte Abnahme der burst-

duration sowie eine Erhöhung der burst-count-per-minute. Erklärungen für diesen Trend wurden bereits für Nikotin diskutiert (Leonard und Salpeter, 1979; Welsh u. a., 2009), jedoch konnten keine weiteren Publikationen gefunden werden, die die Wirkung von Imidacloprid auf das Coiling des Zebrabärblings-Embryos diskutieren. In einer Studie mit geschlüpften Zebrabärblings-Embryonen wurde jedoch festgestellt, dass eine Exposition von  $>6,4$  mg/l die Bewegungsstrecke nach äußeren Reizen reduziert (Faria u. a., 2019a). In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass männliche Ratten, die mit hohen Konzentrationen von Imidacloprid dosiert wurden, eine verengte Lidspalte, Zittern, verändertes Gangbild und Spasmen zeigten (Bomann, 1989). In anderen Studien wurden ebenfalls Gangveränderungen, Zittern und verminderte Aktivität beobachtet (Krieger, 2001; Sheets, 2001, 1994). In jüngerer Zeit wurde Imidacloprid mit einer Beeinträchtigung der kognitiven Funktion bei Ratten in Verbindung gebracht, da sie bei Jungtieren und Erwachsenen verminderte Lernfähigkeiten zeigten (Kara u. a., 2015). Bei Mäusen wurde beobachtet, dass das Aktivitätsniveau im vertrauten Territorium höher war als in der Kontrollgruppe, während bei Tests im offenen Feld ein kontinuierlich vermindertes Aktivitätsniveau festgestellt wurde. Bei Nekropsien wurde auch eine Reduktion des absoluten Hirngewichts festgestellt (Sheets, 1994), was in einer anderen Mausstudie weiter bestätigt wurde, wobei jedoch keine Verhaltensveränderungen beobachtet wurden (Eiben, 1988). Diese Befunde unterstützen die im Coiling-Assay beobachteten Verhaltensänderungen und unterstreichen dessen Empfindlichkeit gegenüber niedrig dosierten, durch Neonicotinoide induzierten Verhaltensänderungen.

Zebrabärbling-Embryonen, die **Thiacloprid** ausgesetzt waren, waren in frühen und späten Entwicklungsstadien unruhiger und zeigten nur wenige morphologische Veränderungen. Frühere Studien errechneten eine 96 hpf  $LC_{50}$  von 25,4 mg/l (Wang u. a., 2020), deutlich niedriger als der extrapolierte 96 hpf  $EC_{50}$ -Wert von  $>500$  g/l des vorliegenden Kapitels. Nur eine veröffentlichte Studie befasste sich mit den Auswirkungen von Thiacloprid auf die Entwicklung des Zebrabärblings-Embryos, wobei eine Exposition von  $<10$  mg/l zu einer erhöhten Herzschlagrate und höhere Konzentrationen zu einer Abschwächung führten, Endpunkte, die zuvor auch bei nikotinexponierten Zebrabärblingen beobachtet wurden (Feng u. a., 2010; Yoo u. a., 2018). Eine weitere Studie fand keine Entwicklungsdeformationen und der Schlupferfolg blieb unbeeinflusst (Osterauer und Köhler, 2008). Nur eine Studie ermittelte bisher den Effekt von Thiacloprid auf die Embryonalentwicklung von Säugetierarten. Hier wiesen isolierte Maus- und Kaninchenembryonen reduzierte Blastomere und einen höheren Anteil an abgestorbenen Blastozysten auf (Babel'ová u. a., 2017). Der bei Thiacloprid-exponierten Individuen beobachtete erhöhte Herzschlag könnte darüber hinaus ein direkterer Effekt auf das Zentralnervensystem sein (Osterauer und Köhler, 2008) und somit möglicherweise eine Erklärung für die erhöhte burst-duration im vorliegenden Kapitel liefern. In einer akuten NT-Screening-Batterie wurden bei Thiacloprid-behandelten Ratten Zitterbewegungen beobachtet, während die allgemeinen lokomotorischen Fähigkeiten unbeeinflusst blieben. Die passive Vermeidungsreaktion von Welpen, die von exponierten Muttertieren geboren wurden, war jedoch verändert (EPA, 2002b). Die insgesamt fehlende Wirkung der Thiacloprid-Exposition auf die Embryonen des Zebrabärblings

wurde zuvor mit der Unfähigkeit erklärt, das lipophile Chorion in größeren Mengen zu durchdringen (EC, 2014b).

Während zwischen 48 und 96 hpf alte Zebrabärblings-Embryonen, die **Clothianidin** ausgesetzt waren, einige morphologische Veränderungen zeigten, waren die einzigen erkennbaren Effekte bei 120 hpf eine veränderte Aktivität in einer bidirektionalen konzentrationsabhängigen Art. Dies könnte teilweise auf die extrem niedrigen Konzentrationen der Substanz zurückzuführen sein, die in den Proben gemessen wurden, was möglicherweise auf die hohe Photolyserate zurückzuführen ist (FAO, 2016). Da jedoch z. B. Dinotefuran in der Medium-Analyse keine solche Abweichung zeigte und im FET-Test keine schweren Effekte auslöste, könnten die fehlenden Beobachtungen bei Clothianidin-exponierten Menschen auch bei nominalen Konzentrationen zutreffend sein. Diese ist die erste Studie, welche Clothianidin im FET-Test verwendet. Es konnten keine Publikationen zur Exposition von Embryonen oder adulten Zebrabärblingen in PubMed und Web of Science gefunden werden konnten. Außerdem konnten keine Details zu den spezifischen zugrunde liegenden Mechanismen der Toxizität gefunden werden. Eine Säugetierstudie zeigte, dass Clothianidin, das trächtigen Mäusen verabreicht wurde, schnell auf die Föten überging (Ohno u. a., 2020), während eine andere Studie eine reduzierte Entwicklung bei isolierten Embryonen beobachtete (Babel'ová u. a., 2017). Zuvor waren Studien durchgeführt worden, die eine signifikante Veränderung des Verhaltens sowohl von adulten als auch von juvenilen Mäusen nach der Aufnahme von Clothianidin mit der Nahrung feststellten (Tanaka, 2012) sowie die Wirkung einer Einzeldosis bei männlichen Mäusen, die zu erhöhter Ängstlichkeit im Elevated-Plus-Labyrinth-Test bei Konzentrationen unterhalb des NOEL führte (Hirano u. a., 2018). Es konnten jedoch keine vergleichbaren Verhaltensstudien für den Zebrabärbling oder andere Fischarten gefunden werden, was den Vergleich der Verhaltenseffekte erschwert.

In dem hier vorgestellten FET-Test induzierte die **Dinotefuran**-Exposition in späteren Stadien einen ähnlichen Trend wie Clothianidin, während sie ab 24 hpf ebenfalls Effekte auslöste. Aufgrund der Ergebnisse der Analyse der Probe wurde angenommen, dass Dinotefuran keine schwerwiegenden Auswirkungen auf die Entwicklung des Zebrabärblings-Embryos hat. Auch hier konnte keine Literatur zur Toxizität von Dinotefuran für Zebrabärblinge gefunden werden, so dass dies die erste öffentlich verfügbare Studie ist, die darüber berichtet. Es wurde jedoch eine Studie mit juvenilen Dickkopf Elritzen (*Gobiocyparis rarus*) durchgeführt, die ergab, dass eine Exposition von 0,5 mg/l die antioxidativen Enzyme sowie verschiedene Gentranskriptionsstufen beeinflusste (Tian u. a., 2020). Es wurde nur eine Studie zur Bewertung der teratogenen Wirkung von Dinotefuran bei Säugetieren durchgeführt, in der festgestellt wurde, dass isolierte Mäuseembryonen eine reduzierte Embryonalentwicklung aufwiesen (Babel'ová u. a., 2017), während in zwei Verhaltensstudien festgestellt wurde, dass männliche Mäuse mit zunehmender Konzentration eine zunehmende Aktivität in Freilandexperimenten zeigten (Yoneda u. a., 2018), aber keine depressionsähnlichen Symptome (Takada u. a., 2018).

Auch **Thiamethoxam** induzierte einige frühe Entwicklungsveränderungen, aber bis 120 hpf wurden in dieser Studie nur Aktivitätsveränderungen festgestellt. Es wurden nur wenige Studien mit Zebraäbblings-Embryonen durchgeführt, von denen nur eine die morphologischen und groben Entwicklungsveränderungen bis 120 hpf bewertete. Es wurde festgestellt, dass 85,2 mg/l Thiamethoxam keinen Einfluss auf das Überleben oder den Schlupferfolg im 48 hpf hatte und auch weitere Parameter (z.B. Gesamtkörperlänge, Augen- und Kopfentwicklung und Kopf-Körper-Winkel) unbeeinflusst blieben. Auch die Oberflächenspannung des Chorions wurde durch die Exposition mit Thiamethoxam nicht beeinflusst (Liu u. a., 2018). Bei Stachelschweinembryonen wurde jedoch eine reduzierte Blastozystenexpansion und ein vermindertes Schlüpfen festgestellt (Nie u. a., 2019), wobei ähnliche Beobachtungen zuvor bei isolierten Mausembryonen gemacht wurden (Babel'ová u. a., 2017). Es konnten keine weiteren Studien zu den teratogenen Wirkungen von Thiamethoxam in Säugetier-Testsystemen gefunden werden. Dies unterstreicht den Bedarf an mehr Daten zur Neurotoxizität von Neonicotinoiden, um die Wirkmechanismen, die an der Toxizität für Nicht-Zielorganismen beteiligt sind, vollständig zu verstehen.

Dieses Kapitel hat erfolgreich gezeigt, dass das (D)NT-Potenzial der getesteten Neonicotinoide mit dem Coiling- und Schwimmverhaltens Assay ausgewertet werden konnte, und dass der Zebraäbblings-Embryo ähnliche Verhaltensänderungen aufweist, wie sie zuvor in Studien an Säugetieren beobachtet wurden. Darüber hinaus können mit der Bestimmung eines "positiven Treffers" in diesen Verhaltens-Assays veränderte Expositionsregime oder externe Stimuli eingeführt werden, um festzustellen, ob die Substanz DNT oder NT gemäß den zuvor genannten Definitionen auf den Zebraäbblings-Embryo auslöst. Befunde sollten weiter mit *In vitro*-Analysen sowie, wenn möglich, mit *In silico*-Modellierung unterstützt werden, um eine (D)NT-Testbatterie zu bilden. Damit diese Assays jedoch allgemein anwendbar werden, ist ein standardisiertes Protokoll erforderlich sowie mehr Mechanismus-basierte Forschung auf dem Gebiet der Neuroentwicklungstoxizität bei subletalen Konzentrationen. Darüber hinaus haben diese Assays das Potenzial, „high-throughput“ Methoden zu sein. Während die Datenanalyse eine Feinabstimmung erfordert, hat die vorliegende Studie gezeigt, dass das neuronale System des Zebraäbblings-Embryos durch Toxine beeinträchtigt werden kann und diese Veränderungen sich in quantifizierbaren Verhaltensänderungen ausdrücken können.

## Kapitel 5. Wie vergleichbar sind Teratogenitätstests mit dem Zebrafisch-Embryo und *In vivo*-Säugetier-Modellen?

Um den Einfluss einer Substanz auf ein beliebiges Entwicklungsstadium erfolgreich bestimmen zu können, müssen Testsysteme eine große Anzahl von Signalwegen, Mechanismen und komplexen Interaktionen umfassen (Schumann, 2010). Dies galt ursprünglich für die traditionellen säugetierbasierten Testsysteme, die die Grundlage der frühen Entwicklungsstudien bildeten (National Research Council und Institute of Medicine, 1988). Die Analyse wurde daher mit den etablierten Modellen fortgesetzt und war unter Berücksichtigung der frühen medizinischen Erkenntnisse weiterhin erfolgversprechend. Seit dem Aufkommen alternativer Testmethoden werden die klassischen Tiermodelle jedoch immer häufiger in Frage gestellt. Diese Modelle galten früher als der heilige Gral für die Vorhersage von Risiken für die menschliche Gesundheit in der Arzneimittelprüfung (Mangipudy u. a., 2014), ungeachtet der in vielen Fällen fehlenden Beweise für die Validität (Bailey u. a., 2014). Tatsächlich haben die Zulassungsanträge für 3.290 zugelassene Medikamente und Formulierungen in den letzten 70 Jahren mehr als 1,5 Millionen Adverse Effekte sowohl bei Tieren als auch bei Menschen ausgelöst (Clark und Steger-Hartmann, 2018), trotz rigoroser Tests. Allein in den Jahren 2018 und 2019 wurden 84% der neu zugelassenen niedermolekularen Arzneimittel an Ratten (*Rattus norvegicus*) oder Kaninchen (z. B. *Oryctolagus cuniculus*) auf unerwünschte Wirkungen in der fötalen Entwicklung getestet, während Mausmodelle (*Mus musculus*) seltener verwendet wurden (Barrow und Clemann, 2021). Die behördliche Entwicklungs- und Reproduktionstoxizitäts(DART)-Prüfung haben sich insgesamt als erfolgreich erwiesen, um katastrophale Ereignisse wie den Contergan-Fall (Jamkhande u. a., 2014) zu verhindern. Es sind jedoch auch die Grenzen dieser Testsysteme in Bezug auf ihre direkte Anwendbarkeit auf den Menschen deutlich geworden (Piersma u. a., 2014), was eine Diskussion über zukünftige Schritte in der Teratogenitätsprüfung rechtfertigt. In diesem Unterkapitel werden gängige Säugetier-Testsysteme mit dem Zebrafisch-Embryo-Modell verglichen, indem die Vor- und Nachteile der einzelnen Modelle, die Interspezies-Konkordanz und ihre Anwendbarkeit auf die Frage der Risikobewertung für die menschliche Gesundheit ermittelt werden.

### 5.1 Einige der klassischen *In vivo*-Säugetiermodelle

Die ICH S5 Revision 3 (R3) besagt, dass Säugetierspezies für DART-Tests bevorzugt werden sollten und dass die Verwendung der gleichen Spezies/des gleichen Stamms in solchen komplexen Tests die Notwendigkeit weiterer Tests oder die Verwendung einer anderen Spezies reduzieren kann (EMA, 2020). Darüber hinaus heißt es in dem Dokument, dass die Teratogenitätsergebnisse von Nagetieren und Kaninchen vergleichbar waren, wenn man die fötale Einzel- oder Mehrfachdosierung sowie die mütterliche Dosierung betrachtet. Andere haben jedoch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Säugetierarten in Frage

gestellt und erklärt, dass solche Studien nicht für die Risikobewertung beim Menschen anwendbar sind (Bailey u. a., 2015, 2014), was eine Diskussion über die Vor- und Nachteile dieser Modelle erforderlich macht.

Die **Ratte** als Modellorganismus bietet die Vorteile einer gut verstandenen Biologie und Embryogenese und ist gleichzeitig ein bereits etabliertes Modell in der Pharmakodynamik und Arzneimittelforschung (Vandamme, 2014). Darüber hinaus ist ihr Reproduktionszyklus sehr gut für DART-Tests geeignet, da sie eine kurze Trächtigszeit und Organogenese hat und im Allgemeinen große Würfe produziert (Burton und Burton, 2002; Davis, 1953). Das Rattenmodell wird bereits in einer Vielzahl von Laboratorien eingesetzt, die eine große Menge an (Wiederholungsdosis-)Toxizitätsdaten produziert haben (Iannaccone und Jacob, 2009), was die Entwicklung und Verbesserung von *In silico*-Modellen sowie die Einordnung neuer Daten in den Kontext früherer Erkenntnisse erleichtert. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass Ratten einige signifikante physiologische Unterschiede zum Menschen aufweisen, u. a. zeitliche Unterschiede im Plazentationsprozess und einen invertierten Dottersack (Soares u. a., 2012). Ein weiterer Unterschied ist die Abhängigkeit der Ratten vom Hormon Prolaktin zur Etablierung der Trächtigkeit und Aufrechterhaltung der frühen Embryonalentwicklung, während es bei anderen Säugetieren mit der Laktation verbunden ist. Da Ratten die funktionsfähigen Dopamin-Typ-2-Rezeptoren fehlen, der Mechanismus, über den Prolaktin reguliert wird (Ben-Jonathan u. a., 2008), sind sie anfälliger für Dopamin-Agonisten, welche die Schwangerschaft stören, als andere Säugetiere oder Menschen. Ratten gelten als weniger empfindlich gegenüber Fruchtbarkeitsstörungen als der Mensch (Lessard u. a., 2019) und sind für die Prüfung von Fremdproteinen nur bedingt geeignet, da sie wenig oder keine pharmakologische Aktivität und eine mögliche immunogenetische Reaktion zeigen (EMA, 2020). Ratten wurden in (D)NT-Studien eingesetzt, z. B. zur Beurteilung von Valproat-induziertem Autismus (Kuwagata u. a., 2009), während z. B. die OECD TG 426 Entwicklungsstörungen bei prä- und postnatal exponierten Rattenwelpen untersucht (OECD, 2007). In einer neueren Publikation wurde dargelegt, dass die gesamte Hirnentwicklung eines Menschen über die Spanne von 18 Jahren in ähnlicher Weise bei Ratten mit 49 Tagen postnatal beobachtet werden kann, wobei auch hier Unterschiede in den Entwicklungsprozessen berücksichtigt werden müssen (Semple u. a., 2013).

Das **Kaninchen**modell bietet ähnliche Vorteile wie die Ratte (Thomas u. a., 2012). Sie sind für serielle Samenprobenentnahmen und Paarungsstudien geeignet und bieten einen tieferen Einblick in die Reaktion auf reproduktionstoxische Substanzen (Williams u. a., 1990), sowie einen plazentaren Transfer von Antikörpern, der dem von Primaten näher kommt (Furukawa u. a., 2014). Nachteile des Kaninchens als Teratogenitäts-Modellorganismus sind jedoch die begrenzte Anwendbarkeit für Fremdproteinstudien und die begrenzten historischen Daten für prä- und postnatale Fertilitätsstudien (EMA, 2020). Darüber hinaus sind Kaninchen von Natur aus anfällig für Spontanaborte (Theunissen u. a., 2016) und die Beurteilung ihres körperlichen Zustands und Wohlbefindens anhand vorgegebener klinischer Anzeichen ist schwieriger als bei anderen Labortieren (Williams u. a., 1990). Kaninchen sind auch empfindlicher gegenüber gastrointestinalen Störungen, was Studien mit

z. B. Antibiotika beeinflusst (Thomas u. a., 2012). Darüber hinaus sind sie empfindlicher gegenüber maternal verabreichter Entwicklungstoxizität und zeigen bei 48% der getesteten Substanzen niedrigere „no observed adverse effect level“-Konzentrationen (NOAEL) als Ratten (Barrow und Clemann, 2021). Schließlich ist es bei der Durchführung von Studien mit Kaninchen häufig notwendig, neben der Toxizitätsstudie auch pharmakodynamische und toxikokinetische Daten zu generieren, da solche Informationen in der Regel für toxikologische Programme nicht zur Verfügung stehen und nicht von anderen Spezies extrapoliert werden können (Williams u. a., 1990). Bei DNT-Tests wurden häufig Kaninchen verwendet, da die Entwicklung zeitlich mit der des Menschen vergleichbar ist (Lim u. a., 2015). In einer Studie zum entwicklungsreproduktiven und neurotoxischen Potenzial von Endosulfan wurde jedoch beispielsweise festgestellt, dass acht Studien mit Rattenmodellen durchgeführt wurden, während nur ein Expositionsversuch für DNT mit Kaninchen durchgeführt wurde (Silva und Gammon, 2009), und nur drei weitere Publikationen konnten auf PubMed gefunden werden, die Neurotoxizitätsstudien mit Kaninchen diskutierten (Muzylak und Maslinska, 1992; Petit u. a., 1985; Yokel u. a., 1994), von denen nur Petit u. a., (1985) Effekte an Kaninchen Jungtieren untersuchten.

Auch **Mäuse** haben im Labor ähnliche Vorteile und Einschränkungen wie Ratten. Sie sind seit vielen Jahren der "Modellorganismus der Wahl" in pharmakologischen Studien (Jorgenebert u. a., 2007) und bieten eine solide Datenbasis, anhand derer neu generierte Ergebnisse bewertet werden können. Darüber hinaus haben sie relativ kurze Reproduktionszyklen und produzieren große Würfe und ihre Entwicklung und Organogenese wurde in der Vergangenheit ausgiebig untersucht (Udan und Dickinson, 2010). Das ermöglicht es den Forschern, Abweichungen von der Norm besser zu verstehen. Es ist jedoch zu beachten, dass der Östrogenzyklus von Mäusen noch nicht vollständig verstanden ist (Caligioni, 2009). Genetisch veränderte Modelle sind verfügbar (Chaible u. a., 2017), und aufgrund der geringen Größe der Spezies und der Verfügbarkeit von Ersatzmolekülen werden niedrigere Substanzkonzentrationen benötigt als in anderen Modellen (Bussiere u. a., 2009). Außerdem sind sie dem Menschen genetisch sehr ähnlich (Vandamme, 2014), was die Entwicklung von Medikamenten vorantreibt. Allerdings bieten sie aufgrund ihrer geringen Körper- und Fötusgröße im Vergleich zu anderen Modellorganismen nur kleine Probenvolumina und es ist bekannt, dass Mäuse sehr stressempfindlich sind (Williams u. a., 1990), was sich auf ihr Sozialverhalten zurückführen lässt (Kappel u. a., 2017), was die Haltung von Mäusen kosten- und ressourcenintensiver macht als bei anderen Säugetierarten.

Zu den weniger häufig verwendeten Arten gehören nicht-menschliche Primaten, wie der Makakenaffe (in freier Wildbahn auch als krabbenfressender oder langschwänziger Makake (*Macaca fascicularis*) bekannt) und Minischweine. Während **nicht-menschliche Primaten** insgesamt phylogenetische und physiologische Ähnlichkeiten zum Menschen aufweisen (Harding, 2017), einschließlich der Plazentation (Carter, 2011) und des plazentaren Antikörpertransfers (Pentšuk und van der Laan, 2009), ist das Testen mit solchen Spezies von einer langen Liste von Einschränkungen diktiert. Die K-Selektionsstrategie dieser Säugetiere stellt möglicherweise die größte Einschränkung in der Laborumgebung dar (Pentšuk

und van der Laan, 2009), während ethische Erwägungen (Harding, 2017), das Fehlen historischer Kontrolldaten (Williams u. a., 1990) und hochvariable individuelle Lebensgeschichten zu Beginn der Experimente (Borries u. a., 2013) ebenfalls berücksichtigt werden müssen. Der einschränkendste Faktor für die Anwendung von nicht-menschlichen Primaten in der Forschung ist jedoch die Forderung des ICH S5 (R3) Dokuments, dass diese Spezies nur dann eingesetzt werden sollten, wenn andere Spezies als nicht durchführbar angesehen werden (EMA, 2020). **Minischweine** werden durch Kreuzung verschiedener Schweinearten entwickelt, die auf die spezifischen Forschungsbedürfnisse zugeschnitten sind (Rozkot u. a., 2015) und können als Nicht-Nager-Alternative bei allgemeinen Toxizitätstests verwendet werden. Insgesamt haben sie eine relativ kurze Organogenese und frühe Geschlechtsreife sowie größere Wurfgrößen als andere Nicht-Nagetierarten und einen gut etablierten genetischen Hintergrund (Ganderup u. a., 2012). Darüber hinaus haben ihre anatomischen Ähnlichkeiten zum Menschen ihre Anwendung in der Forschung weiter erhöht (Rozkot u. a., 2015) insbesondere in kardio-vaskulären (Smith und Swindle, 2006), dermatologischen (Nunoya u. a., 2007) und ernährungswissenschaftlichen Studien (Rozkot u. a., 2015). Zu den Einschränkungen zählen jedoch die geringe Anzahl an Laboren weltweit, die Erfahrung mit der Anwendung haben (Bode u. a., 2010), sowie die lange Entwicklungszeit (Ganderup u. a., 2012) und die insgesamt begrenzte Datenverfügbarkeit (Williams u. a., 1990). Die Vergleichbarkeit der Daten wird außerdem durch die Verfügbarkeit von mindestens 45 verschiedenen Minischwein-Rassen erschwert (Smith und Swindle, 2006), die alle einzigartige Merkmale und zugrundeliegende biologische Unterschiede aufweisen (Rozkot u. a., 2015), die die erhaltenen Daten beeinflussen können.

#### 5.1.1 Wie präzise prognostizieren diese *In vivo*-Methoden Teratogenität bei Menschen?

Die meisten Tier-Human-Konkordanz Studien basieren bisher nur auf der Bewertung der wahren Positivraten, wobei falsch-positiv Ergebnissen nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt wird (Clark und Steger-Hartmann, 2018). Während die Bewertung der wahren Positivergebnisse eine Beurteilung der Test-Sensitivität ermöglicht, führt die Vernachlässigung der falsch-positiven Ergebnisse zu einer Überschätzung des Assays in Bezug auf die Vorhersagbarkeit des menschlichen Risikos, da Abweichungen ausgeschlossen werden. Es wurde festgestellt, dass bei der Berechnung der Wahrscheinlichkeitsquotienten (Likelihood Ratios, LR) für echte positive Ergebnisse von Arzneimitteln, für die sowohl Tier- als auch Humandaten verfügbar sind, das Ausbleiben von Effekten bei Tieren eine sehr geringe Vorhersagbarkeit für Reaktionen beim Menschen hat. Das führt zu dem Schluss, dass die vom Tier auf den Menschen übertragenen Ergebnisse „kaum besser sind als das, was sich rein zufällig – oder durch einen Münzenwurf – ergeben würde“ (Bailey u. a., 2014). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Möglichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses mit höherem Molekulargewicht der Testsubstanz zunimmt (Webster, 1988) und eine andere Studie zur Lebertoxizität wies darauf hin, dass die Rate der falsch-positiven Ergebnisse durch höhere Expositionskonzentrationen erhöht wurde (Monticello u. a., 2017), was die Datenanalyse und ihre Zuverlässigkeit weiter beeinträchtigt. Eine kürzlich veröffentlichten Arbeit zeigte außerdem, dass fast alle bewerteten Fälle einen LR-Wert nahe 1 hatten, was

darauf hindeutet, dass das Fehlen einer Beobachtung in einem Tierversuchsmodell statistisch gesehen kein geringes Risiko für den Menschen impliziert (Clark und Steger-Hartmann, 2018). Es ist offensichtlich, dass keine einzige statistische Bewertung oder Maßnahme auf tierversuchsbasierte Daten angewandt werden kann, um die Konkordanz von Tierdaten mit dem Menschen genau zu vergleichen (Monticello u. a., 2017), wodurch ihr Wert weiter in Frage gestellt wird. Darüber hinaus wird den Daten von Nagetieren allein in präklinischen Studien nicht mehr vertraut und die meisten Tests werden nun in Kombination mit einer Nicht-Nagetier-Spezies, wie Hunden oder nicht-menschlichen Primaten, durchgeführt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass dieser Ansatz das Problem der Interspezies-Extrapolation, insbesondere auf den Menschen, nicht löst (Bailey u. a., 2015), da die Übersetzung von Tierstudien in Humantoxizität stark Spezies- und Mechanismus abhängig ist (Clark und Steger-Hartmann, 2018).

Einer der häufig angeführten Vorteile dieser Methoden ist, dass die meisten Testspezies eine kurze Organogenese haben, da dies kürzere Versuchsdauern und geringere Materialkosten im Vergleich zu Organismen mit längerer Organentwicklung ermöglicht. Betrachtet man dies jedoch aus der Perspektive der Risikobewertung für den Menschen, so entspricht dies einem Unterschied in der Entwicklungszeit zwischen dem 10- und 100-fachen (Beekhuijzen, 2018), was die Übertragbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigen kann. Die Organogenese der Ratte dauert in der Regel etwa 10 Tage, während sie beim Menschen ca. 56 Tage dauert. Die pharmakokinetischen Unterschiede sind gering, wobei sich die chemischen Konzentrationen auf Plasmaniveau bei gleicher verabreichter Dosis nur um das 2- bis 3-fache unterscheiden. Dies bedeutet, dass ein einzelnes Expositionereignis in hoher Konzentration bei Nagetieren mit größerer Wahrscheinlichkeit zu dauerhaften Entwicklungsstörungen führt, während Menschen nicht gefährdet sind (Sullivan, 1999). Die derzeitigen Teratologie-Tests an ganzen Tieren haben auch mit einer klaren Dateninterpretation und -korrelation zu kämpfen, die vor allem auf den starken Unterschieden zwischen den Spezies in der Pharmakokinetik und den Stoffwechselwegen beruht. Bailey u. a., (2015) stellten hierzu fest, dass keine Spezies einer anderen Spezies Beweiskraft verleihen kann, man also nicht erwarten könne, dass sein Tiermodell eine hohe Beweiskraft für den Menschen führen würde. Dieses Versagen bei der Vorhersage kann anscheinend nicht durch strengere Testsysteme oder verbesserte Protokolle gelöst werden, da festgestellt wurde, dass die meisten Unterschiede zwischen den Spezies bei den Cytochrom-P450-Enzymen (cyp450) bestehen, die am Stoffwechsel von etwa 90% der Medikamente beteiligt sind (Martinez u. a., 2013).

## 5.2 Der Zebrabärbling

Wie in der Einleitung dieser Dissertation ausführlich diskutiert, bietet der Zebrabärbling als Modellorganismus viele vorteilhafte Eigenschaften, wie z. B. den geringen Kosten- und Zeitaufwand für die Aufrechterhaltung und den vergleichsweise hohen Durchsatz im Vergleich zu Säugetier-Testsystemen sowie die hohe genetische Homologie zum Menschen (Alves-Pimenta u. a., 2018). Durch die Möglichkeit, die embryonale Entwicklung

*Ex utero* zu beobachten, entfällt die Notwendigkeit, das Muttertier zu opfern, um den Fötus zu untersuchen (Westerfield, 2000). Zusätzlich bietet der Zebrabärblings-Embryo die Möglichkeit, spezifische Organe während der Entwicklung zu beurteilen sowie molekulare Ziele im gesamten Organismus zu bestimmen (Delvecchio u. a., 2011). Darüber hinaus stellten Jarque u. a., (2020) starke Korrelationen zwischen bestimmten teratogenen Phänotypen fest, wobei die Induktion eines Phänotyps zu weiteren, parallel auftretenden Endpunkten führt. Dies wurde durch die Unterbrechung bestimmter Entwicklungswege erklärt, die von verschiedenen sich entwickelnden Organen und Geweben geteilt werden (Martínez u. a., 2019). Beim Vergleich von Entwicklungsstudien-Setups dauert die Bewertung von sechs Substanzen im FET-Test nach der OECD-Richtlinie 236 nur wenige Wochen und es müssen keine reifen Individuen geopfert werden (Brannen u. a., 2010), während die Prüfung derselben sechs Substanzen in den von der OECD anerkannten Tierversuchen (z. B. Richtlinien 414 (OECD, 1981b), 416 (OECD, 1983), 421 (OECD, 1995), und 422 (OECD, 1996))  $\geq 341$  Tage dauern und die Tötung von mindestens 560 Tieren erfordern würde (Selderslaghs u. a., 2009). Assays wie der FET-Test haben gezeigt, dass der Zebrabärbling-Embryo ein geeignetes Modell für die Prüfung der Entwicklungstoxizität ist. Dieses Testprotokoll wurde validiert (OECD, 2012, 2011) und es hat sich gezeigt, dass es eine gute Korrelation zu den Daten aus dem AFT Test aufweist (OECD, 2019b).

Der Aspekt der Reproduktionstoxizität von DART-Tests wird üblicherweise in adulten Zebrabärblingen bewertet, jedoch können Indikatoren für endokrine Störungen von Zebrabärblings-Embryonen durch die Messung des Vitellogenin-Spiegels gemessen werden (Alves-Pimenta u. a., 2018). DNT hingegen wird nun auch vermehrt im Zebrabärbling untersucht. Bei Zebrabärblingen wurde eine Beeinflussung der Expression entwicklungsstadiumbedingter Gene unter Ethanol-exposition festgestellt (Fan u. a., 2010), wobei ähnliche Transkriptionsveränderungen in vergleichbaren Studien mit Mäusen (Alfonso-Loeches u. a., 2013), Ratten (González u. a., 2007) und Menschen (Jung u. a., 2010) beobachtet wurden. In anderen Studien wurde das zentrale Nervensystem während der Entwicklung des Zebrabärblings untersucht (Parng u. a., 2007, 2006; Scalzo und Levin, 2004), wobei die Wirkung verschiedener Chemikalien auf die neurale Apoptose und andere Parameter durch *In-situ*-Hybridisierung und Immunfärbung bestimmt wurde, wobei die Daten mit den zuvor an Säugetieren durchgeführten Studien korrelieren (Parng u. a., 2007, 2006; Ton u. a., 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein verändertes primäres und sekundäres Motoneuronwachstum das Schwimmverhalten beeinflusst (Yang u. a., 2011) und zwar durch die Markierung und Visualisierung spezifischer Neuronen und Axonbahnen *in vivo* mit Farbstoffmikroinjektion (d' Amora u. a., 2016). Solche Erkenntnisse weckten ein zunehmendes Interesse an Verhaltensstudien, die zudem eine gute Vergleichbarkeit zu den bereits etablierten Säugetier-Testsystemen aufweisen (d' Amora und Giordani, 2018).

Neben diesen Vorteilen und der Entwicklung sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Aufnahme von Substanzen im Zebrabärblings-Embryo primär über Membranen erfolgt (Pelster und Bagatto, 2010), was zu Unsicherheiten bezüglich der Körperinternen

Konzentrationen führt. Dies kann durch die Analyse von Medium- und Körperkonzentrationen geschehen, die eine Berechnung der Substanzaufnahme und des Metabolismus ermöglichen. Das Chorion wird bis zum Schlüpfen als Barriere betrachtet, was bedeutet, dass nur Substanzen mit kompatiblen physikochemischen Eigenschaften den Zebrafisch-Embryo effektiv erreichen können. Daher sollte der Fokus auf die Größe, das Molekulargewicht, die lipophilen Tendenzen und die mögliche Abhängigkeit von aktivem Transport gelegt werden (Beekhuijzen, 2018). Die Poren des Chorion haben einen Durchmesser von  $\pm 0,17 \mu\text{m}^2$  (Cheng u. a., 2007; Lee u. a., 2007; Rawson u. a., 2000) und beschränken die Aufnahme von Substanzen auf solche von 3 und 4 kDA bei 24 bzw. 48 hpf (Creton, 2004; Pelka u. a., 2017). Obwohl die Dechorionierung ein akzeptiertes und angewandtes Verfahren in bestimmten Assays ist, sollte berücksichtigt werden, dass eine solche Praxis das Potenzial hat, das Experiment zu beeinflussen, indem sie Schäden am Embryo verursacht und die biologischen Parameter der Entwicklung verändert (Adams u. a., 2005; Kim und Tanguay, 2014; Panzica-Kelly u. a., 2015). Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Substanz für die Exposition eines aquatischen Organismus in Lösung gebracht werden muss, was häufig den Einsatz von Lösungsmitteln wie DMSO erfordert. Studien haben ergeben, dass die Verwendung solcher Lösungsmittel die Aufnahme der Substanz beeinflusst, was wiederum die Vorhersagbarkeit des Tests beeinträchtigt (Hallare u. a., 2006; Kais u. a., 2013). Darüber hinaus können DMSO und andere Lösungsmittel von sich aus Entwicklungsveränderungen und verzögertes Schlüpfen induzieren, was die Ergebnisse weiter beeinflusst (Galvao u. a., 2014; Kais u. a., 2013). Die Verfügbarkeit hängt mit der Lipophilie der Substanz zusammen (Peterson und Fishman, 2011), weshalb mit zunehmender Lipophilie eine erhöhte Toxizität gemessen werden kann (Padilla u. a., 2012). Darüber hinaus ist bekannt, dass Zytochrom-p-Enzyme, die für den Arzneimittelstoffwechsel und andere biologische Funktionen benötigt werden, im Zebrafisch vorhanden sind (Corley-Smith u. a., 2006; Lörracher und Braunbeck, 2020; Tseng u. a., 2005; Wang-Buhler u. a., 2005), aber es bleibt unklar, wie viel von einer Substanz vom Zebrafisch-Embryo aufgenommen und wie effektiv sie metabolisiert wird. Solche Herausforderungen können z. B. durch die Verwendung eines exogenen Säugetier-Stoffwechselaktivierungssystems umgangen werden, das auf der Prämisse basiert, dass mikrosomale Proteine aus der Säugetierleber im Expositionsmedium die Substanz metabolisieren, bevor sie in das Zebrafisch eindringt, wodurch eine mit der menschlichen Aufnahme vergleichbare Exposition ermöglicht wird (Busquet u. a., 2008). Auch wenn dies einen zusätzlichen Schritt im Expositionsprotokoll erfordert und von Metaboliten Analysen des Mediums begleitet werden sollte, kann es ein stabileres und vergleichbares Ergebnis liefern.

### 5.2.1 Wie präzise prognostiziert der Zebrafisch Teratogenität bei Säugetieren?

Das Modell des Zebrafisch bietet neben seiner genetischen Konservierung verschiedene experimentelle Vorteile gegenüber klassischen Säugetiermodellen. Allerdings wird häufig die Auffassung vertreten, dass Säugetiermodelle dem Menschen entwicklungs- und reproduktionsbiologisch näher verwandt sind, wodurch die Anwendbarkeit des Zeb-

rabärblings in Frage gestellt wird (Jarque u. a., 2020). Bei der Prüfung der Entwicklungstoxizität wurde festgestellt, dass der Zebrabärbling eine hohe Vorhersagekraft für die Toxizität bei Säugetieren hat, mit einer Sensitivität und Spezifität zwischen 70 und 80% bei Studien mit Ratten und 80% Vorhersagekraft bei der Bewertung mit Kaninchenstudien (Hagstrom u. a., 2019; Theunissen u. a., 2017; Yamashita u. a., 2014; Zhang u. a., 2012). Es hat sich allgemein durchgesetzt, dass das Zebrabärbling-Modell in Entwicklungsneurotoxizitäts-Assays vergleichbar mit dem von Säugetieren abschneidet (Horzmann und Freeman, 2018) und zwar mit einer Konkordanz zwischen 55 und 100% (Brannen u. a., 2010; Padilla u. a., 2011; Selderslaghs u. a., 2009). Die Exposition gegenüber exogenem Vitamin A induzierte z. B. teratogene Effekte bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Hamstern, Kaninchen, Hunden, Schweinen, Hühnern und Affen sowie beim Zebrabärbling (Geelen und Peters, 1979). Häufig beobachtete Entwicklungsveränderungen bei Mäusen nach früher Gestationsexposition sind Exenzephalie, Gaumenspalte, Spina bifida, Augendefekte, Hydrozephalie und Verkürzung des Unter- und Oberkiefers (Collins und Mao, 1999), sowie Beeinträchtigungen des Herzens, des Skelettaufbaus und der Gliedmaßen (Ross u. a., 2000). Selderslaghs et al. (2010) beobachteten ähnliche Effekte im Zebrabärblings-Embryo, darunter Augen- und Otolithen Fehlbildungen sowie kardiovaskuläre Defekte, Ödeme und grobe Skelettfehlbildungen. Brannen et al. (2010) stellten außerdem fest, dass das Zebrabärblings-Embryo-Modell sehr niedrige falsch-positive und -negative Raten aufwies (15 bzw. 11%) und dass alle getesteten potenten Teratogene korrekt als solche identifiziert wurden. Die einzigen festgestellten falsch-positiven Reaktionen wurden durch BMS-2, ein allgemeines Toxikum bei Ratten mit nachgewiesener Nicht-Teratogenität beim Menschen (Field u. a., 1993; Plasterer u. a., 1985) und Dimethylphthalat ausgelöst, während BMS-10 und Valproinsäure falsch-negative Reaktionen hervorriefen. In *In vivo*-Studien mit Säugetieren induzierte eine BMS-10-Exposition Skelettdeformationen bei Mäusen, aber nicht bei Ratten oder Kaninchen, und diese speziesspezifische Teratogenität wurde entweder als Produkt der mangelnden Empfindlichkeit des Zebrabärblings oder als Ergebnis des begrenzten Entwicklungszeitrahmens, der im FET-Test bewertet wurde, angesehen (Brannen u. a., 2010). Brannen u. a. (2010) erklärten das falsch-negative Ergebnis von Valproinsäure mit der hohen speziesspezifischen Empfindlichkeit der Substanz und dass dem Zebrabärbling möglicherweise das notwendige teratogene Signal fehlt. Es wird vermutet, dass der Mensch insgesamt empfindlicher für Valproinsäure-induzierte Teratogenität ist als andere Säugetier-basierte Testsysteme (Nau, 1986). In gentechnisch veränderten Zebrabärbling-Linien induzierte Valproinsäure-Exposition jedoch Fehlbildungen wie z. B. Gefäßdefekte bei Tg(fli1:EGFP)y10-Embryonen (Isenberg u. a., 2007), die durch eine rein makroskopische Beurteilung nicht beobachtet werden konnten. Insgesamt wurde beobachtet, dass das Zebrabärblings-Embryo-Modell in der Lage ist, die Teratogenität einer Substanz in Nagetieren mit einer Sensitivität von 94%, einer Spezifität von 90% und einer Gesamtgenauigkeit von 87% vorherzusagen (Jarque u. a., 2020). Dies übertrifft die 56% Konkordanz, die bei Teratogenitätstest zwischen Ratten, Kaninchen und Mäusen beobachtet wurde (Hurtt u. a., 2003).

Die beim Zebraärbling beobachteten phänotypischen Veränderungen und die bei Säugtieren festgestellten unterscheiden sich weiterhin in verschiedenen Aspekten (Nishimura u. a., 2015). Während man argumentieren könnte, dass die Veränderungen in der Flossenstrahlentwicklung von Fischen mit der Gliedmaßen- oder Fingerentwicklung bei Säugtieren vergleichbar sind (Shubin u. a., 2009; Stickney u. a., 2000; Wake u. a., 2011), verursachten Substanzen wie Tetrahydropyrimidin beim Zebraärbling dorsale Flossenmissbildungen, induzierten aber keine vergleichbaren Endpunkte bei Kaninchen und Ratten (Van den Bulck u. a., 2011). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass verschiedene Substanzen, die beim Zebraärbling die Dotterentwicklung und/oder -resorption beeinträchtigen, bei Säugtieren nur Craniofaziale Missbildungseffekte hervorrufen (Brannen u. a., 2010), wobei kein derzeit bekannter Signalweg diese Beobachtungen erklärt. Eine detaillierte Analyse der unterschiedlichen Organentwicklung in Zebraärblingen und Säugtier-Testsystemen wurde von Nishimura et al. (2015) veröffentlicht und es sollte mehr Aufmerksamkeit auf die Bestimmung solcher Ähnlichkeiten und Unterschiede sowie auf das Verständnis der zugrunde liegenden Signalwege gerichtet werden.

### 5.3 Kann der Zebraärbling Teratogenität beim Menschen prognostizieren?

Bei der Betrachtung von Tierversuchen in der Arzneimittelprüfung oder Risikobewertung wird immer deutlicher, dass die wissenschaftliche Gemeinschaft beim Thema Teratogenitätstests stark gespalten ist. Säugtier- und Nicht-Säugtier-Testsysteme haben in der Vergangenheit zu großen Erfolgen geführt. Es gibt jedoch immer mehr Hinweise darauf, dass der Einsatz der Alternativmodelle und ein weniger "Alles-oder-Nichts"-Ansatz für tierversuchsbasierte Daten erforderlich ist. Eine Studie zeigte, dass das Zebraärblings-Embryo-Modell in der Lage war, die menschliche Teratogenität einer Chemikalie mit einer Gesamtgenauigkeit von 74% vorherzusagen, basierend auf der Sensitivität von 86% und der Spezifität von 87% (Jarque u. a., 2020). Die von Jarque u. a. (2020) erzielten Ergebnisse erwiesen sich bei der Bestimmung der Vorhersagbarkeit als vergleichbar mit anderen Zebraärblings-Embryo-Studien (Dach u. a., 2019; Inoue u. a., 2016; Jarque u. a., 2020; Yamashita u. a., 2014), was die allgemeine Robustheit des Testsystems zeigt. Darüber hinaus wurden einige betrachtete Substanzen, die im Zebraärbling-Modell als falsch positiv oder -negative gelten, häufig auch in anderen experimentellen Modellen und in einigen Fällen beim Menschen als solche bestimmt. Während beim derzeitigen Stand der Wissenschaft kein Testsystem eine 100%ige Genauigkeit bei der Vorhersage von teratogenen Substanzen beim Menschen besitzt (wenn man klinische Studien am Menschen aus ethischen Gründen ausschließt), ist das Zebraärbling-Modell im Bereich der Bewertung der Entwicklungstoxizität sehr vielversprechend und sollte im pharmazeutischen und legislativen Entscheidungsprozess mehr Gewicht erhalten.



## Chapter 6. Fazit: Ist der Zebrafisch-Embryo ein geeignetes Modell für Teratogenitätstests?

Die in dieser Dissertation vorgestellten Daten liefern neue Einblicke in morphologische und verhaltensbezogene Aspekte der Teratogenitätstests im Zebrafisch-Embryo. Die vorgestellten FET-Test Ergebnisse unterstreichen, zusammen mit früheren Studien, die Bedeutung dieser durchsatzstarken, kosten- und zeiteffizienten Methode. Die vorgestellten Daten zu den entwicklungs- und reproduktionstoxischen (DART) Substanzen unterstreichen die Fähigkeit des FET-Tests, Substanzen mit teratogenem Potenzial für den Menschen mit hoher Genauigkeit zu identifizieren, mit weniger falsch negativen und positiven Ergebnissen als andere Organismen, die üblicherweise bei Teratogenitätstests verwendet werden (Brannen u. a., 2010). Während der FET-Test, wie er in der OECD TG 236 (OECD, 2013) beschrieben ist, für die Prüfung der akuten Toxizität akzeptiert wurde, liefert diese Arbeit Hinweise darauf, dass bestimmte Endpunkte, die derzeit außerhalb des Anwendungsbereichs der von der OECD akzeptierten TG liegen, zu maßgeschneiderten Folgebewertungen führen könnten und somit die Entwicklung von AOPs und das Verständnis der zugrunde liegenden toxikologischen Mechanismen unterstützen. Wie in Kapitel 5 beschrieben, hat diese Arbeit durch den Vergleich der im FET-Test erhaltenen DART-Ergebnisse mit denen aus verschiedenen *In vitro*-Assays gezeigt, dass das Zebrafisch-Embryo Modell negative Substanzen vorhersagen kann und die beobachteten Diskrepanzen zwischen den Testsystemen immer noch innerhalb der zuvor berechneten Sensitivität und Genauigkeit liegen, die sowohl bei Zebrafisch-Embryonen (Jarque u. a., 2020) als auch bei anderen Tier-Testsystemen (Hurt u. a., 2003) beobachtet wurden. Während der Zebrafisch-Embryo jedoch seine Anwendbarkeit für die Bewertung der Teratogenität gezeigt hat, kann sich der Metabolismus bestimmter Substanzen aufgrund der Natur des Testorganismus unterscheiden (d'Amora und Giordani, 2018). Das aquatische Habitat stellt außerdem eine Herausforderung für das Dosierungsregime und die Sicherstellung genauer interner Konzentrationen dar, verglichen mit der Dosierung bei Säugetieren, z. B. durch Injektion oder orale Einnahme. Darüber hinaus ist der Zebrafisch aufgrund seiner *Ex utero*-Entwicklung weniger geeignet für Studien, die z. B. die Plazentaexposition bestimmen (d'Amora und Giordani, 2018; Rubinstein, 2006). Schließlich kann das Chorion, wie bereits erwähnt, bei Expositionsstudien eine Herausforderung darstellen, da es aufgrund der Lipophilie und geringen Porengröße der Membran die Passage größerer Moleküle und geladener Substanzen behindert (Lajis, 2018).

Die Ergebnisse der Verhaltensstudien unterstreichen nachdrücklich die Anwendbarkeit des Zebrafisch-Embryos zur Bestimmung der Neurotoxizität auf einer Verhaltensskala und damit seine Anwendbarkeit für Teratogenitätstests. Hier zeigt der Coiling-Assay, dass Entwicklungsneurotoxizität erfolgreich induziert und im ersten integrierten Verhaltensendpunkt, dem Coiling, beobachtet wurde, dass sich aus dem zufälligen neuronalen Feuern bei 21 hpf zu dem Verhalten entwickelt, das später das Schlüpfen der Embryonen ermöglicht.

Dies zeigt, dass der Zebrafärlings-Embryo nicht nur in der Lage ist, neurotoxische Wirkungen auf Axonbahnfindungsgene zu zeigen, sondern auch die Beobachtung von Effekten auf einer organismischen Skala ermoglicht, indem das Verhaltensmuster verandert wird. Auuerdem geschieht dies innerhalb der ersten Tage nach der Befruchtung, also viel frueher als bei den ueblicherweise verwendeten Verhaltensmodellen, die Nagetiere oder andere Saeugetier-Testmodelle verwenden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse haben die Basis des Coiling Assays in der Verhaltensbeurteilung weiter gefestigt und wichtige neue Daten zur Empfindlichkeit des Zebrafärlings-Embryos gegenueber neuroaktiven Substanzen geliefert. Darueber hinaus haben die hier vorgestellten Daten gezeigt, dass durch die Verandderung der Aufzucht die Auspraegung frueher Entwicklungsparameter signifikant beeinflusst wird, was die Anwendbarkeit des Coiling-Assays auf weitere Verhaltenstests, die die Kommunikationsentwicklung oder den synchronisierten Schlupf beinhalten, verdeutlicht.

Ein klares konzentrations- und zeitabhaengiges Verhaltensprofil war fuer die verschiedenen hier getesteten DART-Substanzen offensichtlich, waehrend die DNT-Substanzen die fruehen bzw. spaeten Entwicklungseffekte der Neonicotinoide unterstrichen, wie im Basalschwimm-Assay gezeigt wurde. Dies unterstuetzt die Vielseitigkeit des Zebrafärlings-Embryos im Bereich der Teratogenitaetstests und unterstreicht gleichzeitig die Notwendigkeit, die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen, die zu den Verandderungen im Verhalten fuehren. Eine fruehere Studie hat gezeigt, dass der Zebrafärling in der Lage ist, mit einem hohen Grad an Sicherheit zwischen neurotoxischen und nicht-neurotoxischen Substanzen zu unterscheiden, wobei er auch eine 90%ige Uebereinstimmung mit Saeugetierdaten zeigte (Selderslaghs u. a., 2013). Verschiedene Studien haben seine Anwendbarkeit fuer die Risikobewertung beim Menschen hervorgehoben, waehrend er auuerdem eine ethisch weniger belastete Alternative zu bietet. Die genetische Homologie des Zebrafärlings mit dem Menschen sowie die Aehnlichkeit im Aufbau des zentralen Nervensystems sind ueberzeugende Argumente fuer den Zebrafärling als Teratogenitaetsmodell (Howe u. a., 2013; Kalueff u. a., 2014). Verschiedene bei Saeugetieren definierte Hirnregionen lassen sich im sich entwickelnden Zebrafärlings-Gehirn leicht bestimmen (Wullimann, 2009), was den Zebrafärlings-Embryo zu einem erstklassigen Kandidaten fuer die Beurteilung von Entwicklungsverandderungen macht (Cowden u. a., 2012; d'Amora und Giordani, 2018; Fan u. a., 2010). Unter Beruecksichtigung all dieser Erkenntnisse wurde der Zebrafärling als erfolgreiches intermediäres Modellsystem mit Hochdurchsatzpotenzial im Bereich der Entwicklungsneurotoxizitaet vorgeschlagen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Forschung zeigt, dass der Zebrafärlings-Embryo zwar ein anwendbares Teratogenitaetsmodell ist, jedoch mehr Aufmerksamkeit auf die Entwicklung von Standardprotokollen gelegt werden muss, um die Vergleichbarkeit zu erhoehen, den Vergleich von Ergebnissen zu erleichtern und die Weiterentwicklung des aktuellen Verstaendnisses von Neurotoxizitaet zu ermoglichen (d'Amora und Giordani, 2018).

Diese Dissertation kommt zu dem Schluss, dass der Zebrafärlings-Embryo fuer Teratogenitaetstests bei der Bewertung von DART und DNT mit Relevanz fuer die menschliche Gesundheit geeignet ist. Darueber hinaus gibt es nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft

kein perfektes Testsystem für Teratogenitätstests zur Risikobewertung beim Menschen. Die derzeit verwendeten Tiermodelle sind wertvoll und für bestimmte Aspekte der Teratogenitätstests anwendbar. Allerdings stimmen die Daten aus Studien mit Nagetieren und Nicht-Nagetieren häufig weniger gut mit Beobachtungen am Menschen überein. Darüber hinaus hat sich in anderen Studien gezeigt, dass der Zebrabärblings-Embryo aufgrund der morphologischen und Habitat bedingten Unterschiede zum Menschen besser anwendbar ist, als ursprünglich angenommen und möglicherweise angenommen wurde, und dass er eine vielversprechende Alternative zu etablierten Testsystemen darstellt.

## Ausblick

- Eine Weiterentwicklung des FET-Tests durch Hinzufügen umfangreicher Listen von Veränderungen sowie einiger (semi-)quantitativer morphologischer Veränderungen würde eine umfassendere Bewertung der Toxizität von Substanzen ermöglichen und die Robustheit und Zuverlässigkeit des Tests erhöhen. Diese Endpunkte sollten daher in einer Mischung aus bekannten Teratogenen, Substanzen mit spezifischen Toxizitäten sowie ungetesteten Substanzen getestet werden, um die Vorhersagekraft des FET-Tests über seine derzeitige Anwendung hinaus weiter zu verbessern.
- Die Forschung muss sich auf die Bewertung der Toxizitätsmechanismen für Teratogene in Zebrabärblings-Embryos konzentrieren (z. B. durch Verwendung von Mutanten), die dann in die *In silico*- und pharmakologischen Datenbanken in Risikobewertungsprojekten einfließen können. Dies würde die Entwicklung des endpunkterweiterten FET-Tests weiter unterstützen und die Integration in das AOP-Entwicklungsnetzwerk erleichtern.
- Entwicklungsverhaltens-Assays haben sich als nützlich und empfindlich erwiesen; allerdings sollte den Aspekten der Datenerfassung und -analyse dieser Protokolle mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden, um einen weiteren Schritt zum Verständnis der Auswirkungen einer niedrig konzentrierten Exposition auf das Verhalten des Zebrabärblings-Embryos zu machen. Dies sollte mehr Studien beinhalten, die sich auf die frühe embryonale Kommunikation und die zugrundeliegenden Wege der Verhaltensänderungen konzentrieren, sowie das Testen von Substanzen im Coiling Assay mit bekannten Verhaltenseffekten in anderen Modellorganismen, um ein besseres Verständnis vergleichbarer sozialer und lokomotorischer Endpunkte zu erhalten, die in diesen aquatischen Wirbeltieren zu bewerten sind.



## Bibliographie

- Abella, V., Santoro, A., Scotecce, M., Conde, J., López-López, V., Lazzaro, V., Gómez-Reino, J.J., Meli, R., Gualillo, O., 2015. Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) induce chondrocyte cell death through multiple pathways. *Toxicol. Lett.* 234, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.02.001>
- Adams, S.L., Zhang, T., Rawson, D.M., 2005. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 64, 1591–1602. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.018>
- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B., 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615–616. <https://doi.org/10.1038/282615a0>
- Alfonso-Loeches, S., Pascual, M., Guerri, C., 2013. Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology* 311, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.03.001>
- Ali, S., Champagne, D.L., Richardson, M.K., 2012. Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behav. Brain Res.* 228, 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.020>
- Altenhofen, S., Nabinger, D.D., Wiprich, M.T., Pereira, T.C.B., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2017. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 180, 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.029>
- Alves-Pimenta, S., Colaço, B., Oliveira, P.A., Venâncio, C., 2018. Biological Concerns on the Selection of Animal Models for Teratogenic Testing, in: *Teratogenicity Testing*. S. 61–93. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7883-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7883-0_3)
- Alwan, S., Chambers, C., 2015. Identifying human teratogens: An update. *J. Pediatr. Genet.* 04, 039–041. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1556745>
- Andreozzi, R., Marotta, R., Paxéus, N., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319–1330. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00769-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00769-5)
- Andrieux, L., Langouët, S., Fautrel, A., Ezan, F., Krauser, J. a, Savouret, J.F., Guengerich, F.P., Baffet, G., Guillouzo, A., 2004. Aryl hydrocarbon receptor activation and cytochrome P450 1A induction by the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 65, 934–943. <https://doi.org/10.1124/mol.65.4.934>
- Anonymous, 1999. Report no. RD-09537N: Two-generation reproduction study with NI-25 in rats (reproduction and fertility effects).
- Anonymous, 1997. Report no. RNP 509/970851: Acetamidrid - Neurotixicity in rats by acute oral administration.
- Anonymous, 1992. Report no. G-0769: Acetamidrid - Thirteen week dietary subchronic toxicity study in mice.
- Aschauer, L., Carta, G., Vogelsang, N., Schlatter, E., Jennings, P., 2015. Expression of xenobiotic transporters in the human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1. *Toxicol. Vitr.* 30, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.003>

- Aubret, F., Blanvillain, G.G., Bignon, F., Kok, P.J.R.R., 2016. Heartbeat, embryo communication and hatching synchrony in snake eggs. *Sci. Rep.* 6, 6–10. <https://doi.org/10.1038/srep23519>
- Avila, J., Serrano, L., Maccioni, R.B., 1987. Regulatory aspects of the colchicine interactions with tubulin. *Mol. Cell. Biochem.* 73, 29–36. <https://doi.org/10.1007/BF00229373>
- Awoyemi, O.M., Kumar, N., Schmitt, C., Subbiah, S., Crago, J., 2019. Behavioral, molecular and physiological responses of embryo-larval zebrafish exposed to types I and II pyrethroids. *Chemosphere* 219, 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.026>
- Babel'ová, J., Šefčíková, Z., Čikoš, Š., Špírková, A., Kovaříková, V., Koppel, J., Makarevich, A. V., Chrenek, P., Fabian, D., 2017. Exposure to neonicotinoid insecticides induces embryotoxicity in mice and rabbits. *Toxicology* 392, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.011>
- Bailey, J., Thew, M., Balls, M., 2015. Predicting human drug toxicity and safety via animal tests: Can any one species predict drug toxicity in any other, and do monkeys help? *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 43, 393–403. <https://doi.org/10.1177/026119291504300607>
- Bailey, J., Thew, M., Balls, M., 2014. An analysis of the use of animal models in predicting human toxicology and drug safety. *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 42, 181–199. <https://doi.org/10.1177/026119291404200306>
- Baker, E.L., Warren, M., Zack, M., Dobbin, R.D., Miles, J.W., Miller, S., Alderman, L., Teeters, W.R., 1978. Epidemic malathion poisoning in Pakistan malaria workers. *Lancet* 1, 31–34. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)90375-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)90375-6)
- Bal-Price, A., Hogberg, H.T., Crofton, K.M., Daneshian, M., FitzGerald, R.E., Fritsche, E., Heinonen, T., Hougaard Bennekou, S., Klima, S., Piersma, A.H., Sachana, M., Shafer, T.J., Terron, A., Monnet-Tschudi, F., Viviani, B., Waldmann, T., Westerink, R.H.S., Wilks, M.F., Witters, H., Zurich, M.G., Leist, M., 2018. Recommendation on test readiness criteria for new approach methods in toxicology: Exemplified for developmental neurotoxicity. *ALTEX Altern. zu Tierexperimenten* 35, 306–352. <https://doi.org/10.14573/altex.1712081>
- Ballantyne, B., Snellings, W.M., 2005. Developmental toxicity study with triethylene glycol given by gavage to CD rats and CD-1 mice. *J. Appl. Toxicol.* 25, 418–426. <https://doi.org/10.1002/jat.1089>
- Bambino, K., Chu, J., 2017. Zebrafish in toxicology and environmental health, in: *Current Topics in Developmental Biology*. S. 331–367. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007>
- Barros, T.P., Alderton, W.K., Reynolds, H.M., Roach, A.G., Berghmans, S., 2008. Zebrafish: An emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1400–1413. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.249>
- Barrow, P., Clemann, N., 2021. Review of embryo-fetal developmental toxicity studies performed for pharmaceuticals approved by FDA in 2018 and 2019. *Reprod. Toxicol.* 99, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.06.013>
- Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Zivna, D., Blahova, J., Marsalek, P., Zelnickova, L., Bartos, M., di Tocco, F.C., Faggio, C., 2013. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of

- oxidative stress. *Neuro Endocrinol. Lett.* 34 Suppl 2, 102–8.
- Basnet, R., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., Memo, M., 2019. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicines* 7, 23. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023>
- Beekhuijzen, M., 2018. Developmental and reproductive toxicity (DART) testing: The next generation.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strähle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat. Neurosci.* 5, 111–118. <https://doi.org/10.1038/nn788>
- Beker van Woudenberg, A., Snel, C., Rijkmans, E., de Groot, D., Bouma, M., Hermsen, S., Piersma, A., Menke, A., Wolterbeek, A., 2014. Zebrafish embryotoxicity test for developmental (neuro)toxicity: Demo case of an integrated screening approach system using anti-epileptic drugs. *Reprod. Toxicol.* 49, 101–116. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.07.082>
- Belanger, S.E., Balon, E.K., Rawlings, J.M., 2010. Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. *Aquat. Toxicol.* 97, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.11.020>
- Belanger, S.E., Rawlings, J.M., Carr, G.J., 2013. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1768–1783. <https://doi.org/10.1002/etc.2244>
- Belpaire, C., Geeraerts, C., Roosens, L., Neels, H., Covaci, A., 2011. What can we learn from monitoring PCBs in the European eel? A Belgian experience. *Environ. Int.* 37, 354–364. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.006>
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C.R., LaPensee, E.W., 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr. Rev.* 29, 1–41. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0017>
- Bencan, Z., Levin, E.D., 2008. The role of  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors in the nicotine-induced anxiolytic effect in zebrafish. *Physiol. Behav.* 95, 408–412. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.07.009>
- Bereketoglu, C., Pradhan, A., 2019. Comparative transcriptional analysis of methylparaben and propylparaben in zebrafish. *Sci. Total Environ.* 671, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.358>
- Berndt, C., Poschmann, G., Stähler, K., Holmgren, A., Bräutigam, L., 2014. Zebrafish heart development is regulated via glutaredoxin 2 dependent migration and survival of neural crest cells. *Redox Biol.* 2, 673–678. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.04.012>
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., Greenamyre, J.T., 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3, 1301–1306. <https://doi.org/10.1038/81834>
- Bilotta, J., 2000. Effects of abnormal lighting on the development of zebrafish visual behavior. *Behav. Brain Res.* 116, 81–87. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00264-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00264-3)
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebaek, N.E., Main, K.M., 2006. Environmental chemicals and thyroid function. *Eur. J. Endocrinol.* 154, 599–611. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02128>
- Bode, G., Clausing, P., Gervais, F., Loegsted, J., Luft, J., Nogues, V., Sims, J., 2010. The

- utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 62, 196–220. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.05.009>
- Bogdanova, A.Y., Gassmann, M., Nikinmaa, M., 2002. Copper ion redox state is critical for its effects on ion transport pathways and methaemoglobin formation in trout erythrocytes. *Chem. Biol. Interact.* 139, 43–59. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(01\)00287-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00287-3)
- Bomann, R., 1989. Study No. 100040: NTN 33893 study for acute oral toxicity to rats. Wuppertal, Germany.
- Borries, C., Gordon, A.D., Koenig, A., 2013. Beware of primate life history data: A plea for data standards and a repository. *PLoS One* 8, e67200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067200>
- Brannen, K.C., Panzica-Kelly, J.M., Danberry, T.L., Augustine-Rauch, K.A., 2010. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 89, 66–77. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20223>
- Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N., 2005. Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species -- an update. *ALTEX Altern. zu Tierexperimenten* 22, 87–102. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9297-x>
- Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., Strecker, R., 2015. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 16247–16261. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3814-7>
- Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays“, German Federal Environmental Agency.
- Brendel, K., Corredor, C.F., Bressler, R., 1969. The effect of 4-pentenoic acid on fatty acid oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 340–347. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90838-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90838-9)
- Bretau, S., Lee, S., Guo, S., 2004. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson’s disease. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 857–864. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.014>
- Brito, D.A., Yang, Z., Rieder, C.L., 2008. Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *J. Cell Biol.* 182, 623–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805072>
- Brox, S., Seiwert, B., Küster, E., Reemtsma, T., 2016. Toxicokinetics of polar chemicals in zebrafish embryo (*Danio rerio*): Influence of physicochemical properties and of biological processes. *Environ. Sci. Technol.* 50, 10264–10272. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04325>
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Drapeau, P., 2003. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J. Physiol.* 97, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2003.10.009>
- Burch, R.L., Russel, W.M.S., 1959. The principles of humane experimental technique. London, Methuen.
- Burgess, H.A., Granato, M., 2007. Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *J. Exp. Biol.* 210, 2526–2539. <https://doi.org/10.1242/jeb.003939>
- Burke, A.P., Niibori, Y., Terayama, H., Ito, M., Pidgeon, C., Arsenault, J., Camarero,

- P.R., Cummins, C.L., Mateo, R., Sakabe, K., Hampson, D.R., 2018. Mammalian susceptibility to a neonicotinoid insecticide after fetal and early postnatal exposure. *Sci. Rep.* 8, 16639. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35129-5>
- Burton, M., Burton, R., 2002. *International wildlife encyclopedia*. Marshall Cavendish.
- Bushara, K.O., Goldstein, S.R., Grimes, G.J., Burstein, A.H., Hallett, M., 2004. Pilot trial of 1-octanol in essential tremor. *Neurology* 62, 122–124. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000101722.95137.19>
- Busquet, F., Nagel, R., von Landenberg, F., Mueller, S.O., Huebler, N., Broschard, T.H., 2008. Development of a new screening assay to identify proteratogenic substances using zebrafish *Danio rerio* embryo combined with an exogenous mammalian metabolic activation system (mDarT). *Toxicol. Sci.* 104, 177–188. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn065>
- Busquet, F., Strecker, R., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., Carr, G.J., Cenijn, P., Fochtman, P., Gourmelon, A., Hübler, N., Kleensang, A., Knöbel, M., Kussatz, C., Legler, J., Lillicrap, A., Martínez-Jerónimo, F., Polleichtner, C., Rzodeczko, H., Salinas, E., Schneider, K.E., Scholz, S., van den Brandhof, E.J., van der Ven, L.T.M., Walter-Rohde, S., Weigt, S., Witters, H., Halder, M., 2014. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 496–511. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.05.018>
- Bussiere, J.L., Martin, P., Horner, M., Couch, J., Flaherty, M., Andrews, L., Beyer, J., Horvath, C., 2009. Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals. *Int. J. Toxicol.* 28, 230–253. <https://doi.org/10.1177/1091581809337262>
- Caballero, B., Olguin, N., Campos, F., Farina, M., Ballester, F., Lopez-Espinosa, M.-J., Llop, S., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C., 2017. Methylmercury-induced developmental toxicity is associated with oxidative stress and cofilin phosphorylation. Cellular and human studies. *Neurotoxicology* 59, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.05.018>
- Caligioni, C.S., 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* 48. <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48>
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S.A., 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104, 901–912. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0)
- Carbone, L., 2019. Ethical and IACUC Considerations Regarding Analgesia and Pain Management in Laboratory Rodents. *Comp. Med.* 69, 443–450. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000149>
- Carlson, R.W., Bradbury, S.P., Drummond, R.A., Hammermeister, D.E., 1998. Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 43, 51–68. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00097-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00097-0)
- Carter, A.M., 2011. Comparative studies of placentation and immunology in non-human primates suggest a scenario for the evolution of deep trophoblast invasion and an explanation for human pregnancy disorders. *Reproduction* 141, 391–396. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0530>
- Chaible, L.M., Kinoshita, D., Finzi Corat, M.A., Zaidan Dagli, M.L., 2017. Genetically modified animal models, in: *Animal Models for the Study of Human Disease*.

- Elsevier, S. 703–726. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00027-9>
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., Studer, L., 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. March 27, 275–280. <https://doi.org/10.1038/nbt.1529>. Highly
- Chandler, C.J., Segel, I.H., 1978. Mechanism of the antimicrobial action of pyriithione: Effects on membrane transport, ATP levels, and protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14, 60–68. <https://doi.org/10.1128/AAC.14.1.60>
- Chateauvieux, S., Morceau, F., Dicato, M., Diederich, M., 2010. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2010/479364>
- Cheluvappa, R., Scowen, P., Eri, R., 2017. Ethics of animal research in human disease remediation, its institutional teaching; and alternatives to animal experimentation. *Pharmacol. Res. Perspect.* 5, e00332. <https://doi.org/10.1002/prp2.332>
- Chen, T.-H., Wang, Y.-H., Wu, Y.-H., 2011. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquat. Toxicol.* 102, 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.010>
- Chen, X., Mu, Y., Hu, Y., Kuan, A.T., Nikitchenko, M., Randlett, O., Chen, A.B., Gavornik, J.P., Sompolinsky, H., Engert, F., Ahrens, M.B., 2018. Brain-wide organization of neuronal activity and convergent sensorimotor transformations in larval zebrafish. *Neuron* 100, 876–890.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.042>
- Cheng, J., Flahaut, E., Cheng, S.H., 2007. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 708. <https://doi.org/10.1897/06-272R.1>
- Cheng, W.W., Farrell, A.P., 2007. Acute and sublethal toxicities of rotenone in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Swimming performance and oxygen consumption. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 388–396. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0051-1>
- Cherr, G.N., Fairbairn, E., Whitehead, A., 2017. Impacts of petroleum-derived pollutants on fish development. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 5, 185–203. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022928>
- Chong, C.-M., Ma, D., Zhao, C., Franklin, R.J.M., Zhou, Z.-Y., Ai, N., Li, C., Yu, H., Hou, T., Sa, F., Lee, S.M.-Y., 2015. Discovery of a novel neuroprotectant, BHDPC, that protects against MPP+/MPTP-induced neuronal death in multiple experimental models. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 1057–1066. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.013>
- Christou, M., Kavaliauskis, A., Ropstad, E., Fraser, T.W.K., 2020. DMSO effects larval zebrafish (*Danio rerio*) behavior, with additive and interaction effects when combined with positive controls. *Sci. Total Environ.* 709, 134490. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134490>
- Clark, M., Steger-Hartmann, T., 2018. A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 96, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.04.018>
- Clayton, P.T., Eaton, S., Aynsley-Green, A., Edginton, M., Hussain, K., Krywawych, S.,

- Datta, V., Malingré, H.E.M., Berger, R., van den Berg, I.E.T., 2001. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of  $\beta$ -oxidation in insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 108, 457–465. <https://doi.org/10.1172/JCI200111294>
- Coimbra, A.M., Peixoto, M.J., Coelho, I., Lacerda, R., Carvalho, A.P., Gesto, M., Lyssimachou, A., Lima, D., Soares, J., André, A., Capitão, A., Castro, L.F.C., Santos, M.M., 2015. Chronic effects of clofibric acid in zebrafish (*Danio rerio*): A multigenerational study. *Aquat. Toxicol.* 160, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.013>
- Collins, M.D., Mao, G.E., 1999. Teratology of Retinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 399–430.
- Colón-Cruz, L., Kristofco, L., Crooke-Rosado, J., Acevedo, A., Torrado, A., Brooks, B.W., Sosa, M.A., Behra, M., 2018. Alterations of larval photo-dependent swimming responses (PDR): New endpoints for rapid and diagnostic screening of aquatic contamination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 670–680. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.018>
- Cook, M.J., Fairweather, F.A., 1968. Methods used in teratogenic testing. *Lab. Anim.* 2, 219–228. <https://doi.org/10.1258/002367768781082834>
- Cooley-Andrade, O., Cheung, K., Chew, A.N., Connor, D.E., Parsi, K., 2016. Detergent sclerosants at sub-lytic concentrations induce endothelial cell apoptosis through a caspase dependent pathway. *Apoptosis* 21, 836–845. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1252-3>
- Corley-Smith, G.E., Su, H.-T., Wang-Buhler, J.-L., Tseng, H.-P., Hu, C.-H., Hoang, T., Chung, W.-G., Buhler, D.R., 2006. CYP3C1, the first member of a new cytochrome P450 subfamily found in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1039–1046. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.110>
- Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., MacPhail, R., Jensen, K., Padilla, S., 2012. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. *Reprod. Toxicol.* 33, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.11.111>
- Creton, R., 2004. The calcium pump of the endoplasmic reticulum plays a role in midline signaling during early zebrafish development. *Dev. Brain Res.* 151, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.03.016>
- Crosby, E.B., Bailey, J.M., Oliveri, A.N., Levin, E.D., 2015. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 49, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.04.006>
- d' Amora, M., Rodio, M., Bartelmess, J., Sancataldo, G., Brescia, R., Cella Zancacchi, F., Diaspro, A., Giordani, S., 2016. Biocompatibility and biodistribution of functionalized carbon nano-onions (f-CNOs) in a vertebrate model. *Sci. Rep.* 6, 33923. <https://doi.org/10.1038/srep33923>
- d' Amora, M., Giordani, S., 2018. The utility of zebrafish as a model for screening developmental neurotoxicity. *Front. Neurosci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00976>
- Dach, K., Yaghoobi, B., Schmuck, M.R., Carty, D.R., Morales, K.M., Lein, P.J., 2019. Teratological and behavioral screening of the national toxicology program 91-compound library in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Sci.* 167, 77–91. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy266>

- Dai, W., Wang, K., Zheng, X., Chen, X., Zhang, W., Zhang, Y., Hou, J., Liu, L., 2015. High fat plus high cholesterol diet lead to hepatic steatosis in zebrafish larvae: a novel model for screening anti-hepatic steatosis drugs. *Nutr. Metab. (Lond)*. 12, 42–53. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0036-z>
- Dalbeth, N., Lauterio, T.J., Wolfe, H.R., 2014. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clin. Ther.* 36, 1465–1479. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.07.017>
- Dang, Z., Kienzler, A., 2019. Changes in fish sex ratio as a basis for regulating endocrine disruptors. *Environ. Int.* 130, 104928. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104928>
- Daouk, T., Larcher, T., Roupsard, F., Lyphout, L., Rigaud, C., Ledevin, M., Loizeau, V., Cousin, X., 2011. Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquat. Toxicol.* 105, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.021>
- Darlington, G.J., Kelly, J.H., Buffone, G.J., 1987. Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. *Vitr. Cell. Dev. Biol.* 23, 349–354. <https://doi.org/10.1007/BF02620991>
- David, A., Pancharatna, K., 2009a. Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.01.002>
- David, A., Pancharatna, K., 2009b. Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *J. Appl. Toxicol.* 29, 597–602. <https://doi.org/10.1002/jat.1446>
- Davis, D.E., 1953. The characteristics of rat populations. *Q. Rev. Biol.* 28, 373–401. <https://doi.org/10.1086/399860>
- De Esch, C., Slieker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., de Groot, D., 2012. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini review. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.08.006>
- Delp, J., Funke, M., Rudolf, F., Cediël, A., Bennekou, S.H., van der Stel, W., Carta, G., Jennings, P., Toma, C., Gardner, I., van de Water, B., Forsby, A., Leist, M., 2019. Development of a neurotoxicity assay that is tuned to detect mitochondrial toxicants. *Arch. Toxicol.* 93, 1585–1608. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02473-y>
- Delp, J., Gutbier, S., Klima, S., Hoelting, L., Pinto-Gil, K., Hsieh, J.-H., Aichem, M., Klein, K., Schreiber, F., Tice, R.R., Pastor, M., Behl, M., Leist, M., 2018. A high-throughput approach to identify specific neurotoxicants/developmental toxicants in human neuronal cell function assays. *ALTEX* 35, 235–253. <https://doi.org/10.14573/altex.1712182>
- Delvecchio, C., Tiefenbach, J., Krause, H.M., 2011. The zebrafish: A powerful platform for *in vivo*, HTS drug discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* 9, 354–361. <https://doi.org/10.1089/adt.2010.0346>
- Derivaux, J., Lieguois, F., 1962. Les poisons d'origine vegetale, in: *Toxicologic veterinaire*. S. 251–252.
- DeSesso, J.M., 2017. Future of developmental toxicity testing. *Curr. Opin. Toxicol.* 3, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.04.001>
- Dhillon, G.S., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, S.K., Cledón, M., Verma, M., Surampalli, R.Y., 2015. Triclosan: Current status, occurrence, environmental risks and

- bioaccumulation potential. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 5657–5684. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505657>
- Dietz, R., Rigét, F.F., Sonne, C., Born, E.W., Bechshøft, T., McKinney, M.A., Letcher, R.J., 2013. Three decades (1983–2010) of contaminant trends in East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*). Part 1: Legacy organochlorine contaminants. *Environ. Int.* 59, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.09.004>
- Dixit, R., Husain, R., Mukhtar, H., Seth, P.K., 1981. Effect of acrylamide on biogenic amine levels, monoamine oxidase, and cathepsin D activity of rat brain. *Environ. Res.* 26, 168–173. [https://doi.org/10.1016/0013-9351\(81\)90195-X](https://doi.org/10.1016/0013-9351(81)90195-X)
- Doody, J.S., 2011. Environmentally cued hatching in reptiles. *Integr. Comp. Biol.* 51, 49–61. <https://doi.org/10.1093/icb/icr043>
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Brustein, E., 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* 68, 85–111. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00075-8)
- Du, K., Ramachandran, A., Jaeschke, H., 2016. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol.* 10, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.001>
- Du, Z., Zhang, Y., Wang, G., Peng, J., Wang, Z., Gao, S., 2016. TPhP exposure disturbs carbohydrate metabolism, lipid metabolism, and the DNA damage repair system in zebrafish liver. *Sci. Rep.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep21827>
- Duong, A., Steinmaus, C., McHale, C.M., Vaughan, C.P., Zhang, L., 2011. Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: A systematic review. *Mutat. Res.* 728, 118–38. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.07.003>
- Easter, Jr., S.S., Nicola, G.N., 1996. The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev. Biol.* 180, 646–663. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0335>
- Easter, S.S., Nicola, G.N., 1997. The development of eye movements in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev. Psychobiol.* 31, 267–276. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199712\)31:4<267::AID-DEV4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199712)31:4<267::AID-DEV4>3.0.CO;2-P)
- Eaton, R.C., Farley, R.D., 1974. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. *Copeia* 1974, 195. <https://doi.org/10.2307/1443023>
- EC, 2014a. Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Dinotefuran Product-type 18 (Insecticides, acaricides and to control other arthropods).
- EC, 2014b. Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Clothianidin Product-type 18 (Insecticides, acaricides and products to control other arthropods).
- EC, 2011. Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market. Imidacloprid Product-type 18 (Insecticides, Acaricides and Product to control other Arthropods).
- EC, 2009. Regulation (EC) no 1223/2009 of the European parliament and of the council of 30 November 2009 on cosmetic products, Official Journal of the European Union.
- EC, 2000. Directiev 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for the community action in the field of water policy, Official Journal of the European Communities.

- ECHA, 2020. Animal testing under REACH [WWW Document]. URL <https://echa.europa.eu/animal-testing-under-reach>
- Eiben, R., 1988. Study No. 99808: Pilot range-finding study for carcinogenicity of B6C3F1 mice. One hundred seven day feeding study. Wuppertal.
- Eimon, P.M., Rubinstein, A.L., 2009. The use of *in vivo* zebrafish assays in drug toxicity screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 5, 393–401. <https://doi.org/10.1517/17425250902882128>
- EMA, 2020. ICH S5 (R3) guideline on reproductive toxicology: Detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals.
- Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., Léonard, M., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat. Toxicol.* 97, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>
- EPA, 2002a. Pesticide fact sheet: Acetamiprid.
- EPA, 2002b. Thiacloprid (YRC 2894)/014019 [OPPTS 870.6200 (§ 81-8)] Study type: Acute Neurotoxicity - Rat. MRID 49927703 (Main study), MRID 44927704 (Supplemental study). Kansas, USA.
- EU, 2007. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/4, Official Journal of the European Union.
- Eurostat, 2020. Production and consumption of chemicals by hazard class [WWW Document]. Eurostat Stat. Explain. URL [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Chemicals\\_production\\_and\\_consumption\\_statistics&oldid=493630](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Chemicals_production_and_consumption_statistics&oldid=493630)
- Fahmy, M.A., 2000. Potential genotoxicity in copper sulphate treated mice. *Cytologia (Tokyo)*. 65, 235–242. <https://doi.org/10.1508/cytologia.65.235>
- Faimali, M., Gambardella, C., Costa, E., Piazza, V., Morgana, S., Estévez-Calvar, N., Garaventa, F., 2017. Old model organisms and new behavioral end-points: Swimming alteration as an ecotoxicological response. *Mar. Environ. Res.* 128, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.006>
- Fan, C.Y., Cowden, J., Simmons, S.O., Padilla, S., Ramabhadran, R., 2010. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.065>
- FAO, 2016. FAO Specifications and evaluations for agricultural pesticides. Clothianidin.
- Faria, M., Prats, E., Novoa-Luna, K.A., Bedrossiantz, J., Gómez-Canela, C., Gómez-Oliván, L.M., Raldúa, D., 2019a. Development of a vibrational startle response assay for screening environmental pollutants and drugs impairing predator avoidance. *Sci. Total Environ.* 650, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.421>
- Faria, M., Valls, A., Prats, E., Bedrossiantz, J., Orozco, M., Porta, J.M., Gómez-Oliván, L.M., Raldúa, D., 2019b. Further characterization of the zebrafish model of acrylamide acute neurotoxicity: gait abnormalities and oxidative stress. *Sci. Rep.* 9, 7075. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43647-z>
- Faria, M., Wu, X., Luján-Mondragón, M., Prats, E., Gómez-Oliván, L.M., Piña, B.,

- Raldúa, D., 2020. Screening anti-predator behaviour in fish larvae exposed to environmental pollutants. *Sci. Total Environ.* 714, 136759. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136759>
- Faria, M., Ziv, T., Gómez-Canela, C., Ben-Lulu, S., Prats, E., Novoa-Luna, K.A., Admon, A., Piña, B., Tauler, R., Gómez-Oliván, L.M., Raldúa, D., 2018. Acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish. *Sci. Rep.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26343-2>
- Farrell, K.W., Wilson, L., 1980. Proposed mechanism for colchicine poisoning of microtubules reassembled *in vitro* from *Strongylocentrotus purpuratus* sperm tail outer doublet tubulin. *Biochemistry* 19, 3048–3054. <https://doi.org/10.1021/bi00554a033>
- Feng, Y., Caiping, M., Li, C., Can, R., Feichao, X., Li, Z., Zhice, X., 2010. Fetal and offspring arrhythmia following exposure to nicotine during pregnancy. *J. Appl. Toxicol.* 30, 53–58. <https://doi.org/10.1002/jat.1471>
- Field, E.A., Price, C.J., Sleet, R.B., George, J.D., Marr, M.C., Myers, C.B., Schwetz, B.A., Morrissey, R.E., 1993. Developmental toxicity evaluation of diethyl and dimethyl phthalate in rats. *Teratology* 48, 33–44. <https://doi.org/10.1002/tera.1420480107>
- Flint, O.P., 1993. *In vitro* tests for teratogens: Desirable endpoints, test batteries and current status of the micromass teratogen test. *Reprod. Toxicol.* 7, 103–111. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(93\)90075-I](https://doi.org/10.1016/0890-6238(93)90075-I)
- Freeman, G.B., Sherman, K.A., Gibson, G.E., 1987. Locomotor activity as a predictor of times and dosages for studies of nicotine's neurochemical actions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26, 305–312. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(87\)90123-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(87)90123-7)
- Friedman, M., 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4504–4526. <https://doi.org/10.1021/jf030204+>
- Fung, Y.K., Lau, Y.S., 1989. Effects of prenatal nicotine exposure on rat striatal dopaminergic and nicotinic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33, 1–6. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90419-x](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90419-x)
- Furukawa, S., Kuroda, Y., Sugiyama, A., 2014. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J. Toxicol. Pathol.* 27, 11–18. <https://doi.org/10.1293/tox.2013-0060>
- Gagné, F., André, C., Turcotte, P., Gagnon, C., Sherry, J., Talbot, A., 2013. A comparative toxicogenomic investigation of oil sand water and processed water in rainbow trout hepatocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 309–323. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9888-2>
- Galloway, T.S., Dogra, Y., Garrett, N., Rowe, D., Tyler, C.R., Moger, J., Lammer, E., Landsiedel, R., Sauer, U.G., Scherer, G., Wohlleben, W., Wiench, K., 2017. Ecotoxicological assessment of nanoparticle-containing acrylic copolymer dispersions in fairy shrimp and zebrafish embryos. *Environ. Sci. Nano* 4, 1981–1997. <https://doi.org/10.1039/C7EN00385D>
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M.R., Cordeiro, M.F., 2014. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 28, 1317–1330. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
- Ganderup, N.C., Harvey, W., Mortensen, J.T., Harrouk, W., 2012. The minipig as nonrodent species in toxicology—Where are we now? *Int. J. Toxicol.* 31, 507–528.

<https://doi.org/10.1177/1091581812462039>

- Gao, L., Li, S., Zhang, J., Liang, C., Chen, E., Zhang, S., Chuai, M., Bao, Y., Wang, G., Yang, X., 2016. Excess imidacloprid exposure causes the heart tube malformation of chick embryos. *J. Agric. Food Chem.* 64, 9078–9088. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03381>
- Gao, X.-P., Feng, F., Zhang, X.-Q., Liu, X.-X., Wang, Y.-B., She, J.-X., He, Z.-H., He, M.-F., 2014. Toxicity assessment of 7 anticancer compounds in zebrafish. *Int. J. Toxicol.* 33, 98–105. <https://doi.org/10.1177/1091581814523142>
- Garry, V.F., Truran, P., 2017. Teratogenicity, in: *Reproductive and Developmental Toxicology*. Elsevier, S. 1167–1181. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00062-7>
- Geelen, J.A.G., Peters, P.W.J., 1979. Hypervitaminosis a induced teratogenesis. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 6, 351–375. <https://doi.org/10.3109/10408447909043651>
- Gehrig, J., Pandey, G., Westhoff, J.H., 2018. Zebrafish as a Model for Drug Screening in Genetic Kidney Diseases. *Front. Pediatr.* 6. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00183>
- Gibert, Y., Sassi-Messai, S., Fini, J.-B., Bernard, L., Zalko, D., Cravedi, J.-P., Balaguer, P., Andersson-Lendahl, M., Demeneix, B., Laudet, V., 2011. Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis. *BMC Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-4>
- Ginkel, C.J.W., Rundervoort, G.J., 2010. Increasing incidence of contact allergy to the new preservative 1,2-dibromo-2,4-dicyanobutane (methyl dibromoglutaronitrile). *Br. J. Dermatol.* 132, 918–920. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1995.tb16949.x>
- Giordano, G., Costa, L.G., 2012. Developmental neurotoxicity: Some old and new issues. *ISRN Toxicol.* 2012, 1–12. <https://doi.org/10.5402/2012/814795>
- Glaberman, S., Padilla, S., Barron, M.G., 2017. Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 1221–1226. <https://doi.org/10.1002/etc.3641>
- Glaser, V., Leipnitz, G., Stralio, M.R., Oliveira, J., dos Santos, V.V., Wannmacher, C.M.D., de Bem, A.F., Rocha, J.B.T., Farina, M., Latini, A., 2010. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology* 31, 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.05.012>
- Glass, A.S., Dahm, R., 2004. The zebrafish as a model organism for eye development. *Ophthalmic Res.* 36, 4–24. <https://doi.org/10.1159/000076105>
- Godhe-Puranik, Y., Thorn, C.F., Lambra, J.K., Leeder, J.S., 2013. Valproic acid pathway: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genomics* 23, 236–241. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2>. Valproic
- Goessling, W., Sadler, K.C., 2015. Zebrafish: An important tool for liver disease research. *Gastroenterology* 149, 1361–1377. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.034>
- González, A., Pariente, J.A., Salido, G.M., 2007. Ethanol stimulates ROS generation by mitochondria through Ca<sup>2+</sup> mobilization and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. *Brain Res.* 1178, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.040>
- Gougoux, A., Zan, N., Dansereau, D., Vinay, P., 1989. Experimental Fanconi's syndrome resulting from 4-pentenoate infusion in the dog. *Am. J. Physiol. Physiol.* 257, 959–966. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1989.257.6.F959>

- Green, A.J., Planchart, A., 2018. The neurological toxicity of heavy metals: A fish perspective. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 208, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.11.008>
- Grillner, S., Markram, H., De Schutter, E., Silberberg, G., LeBeau, F.E.N., 2005. Microcircuits in action – from CPGs to neocortex. *Trends Neurosci.* 28, 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.08.003>
- Grosser, T., Yusuff, S., Cheskis, E., Pack, M.A., FitzGerald, G.A., 2002. Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8418–8423. <https://doi.org/10.1073/pnas.112217799>
- Grundlingh, J., Dargan, P.I., El-Zanfaly, M., Wood, D.M., 2011. 2,4-Dinitrophenol (DNP): A weight loss Agent with significant acute toxicity and risk of death. *J. Med. Toxicol.* 7, 205–212. <https://doi.org/10.1007/s13181-011-0162-6>
- Gurvich, N., Berman, M.G., Wittner, B.S., Gentleman, R.C., Klein, P.S., Green, J.B.A., 2005. Association of valproate-induced teratogenesis with histone deacetylase inhibition *in vivo*. *FASEB J.* 19, 1166–1168. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3425fje>
- Haddon, C., Lewis, J., 1996. Early ear development in the embryo of the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Comp. Neurol.* 365, 113–128. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960129\)365:1<113::AID-CNE9>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960129)365:1<113::AID-CNE9>3.0.CO;2-6)
- Hagstrom, D., Truong, L., Zhang, S., Tanguay, R., Collins, E.-M.S.M.S., 2019. Comparative analysis of zebrafish and planarian model systems for developmental neurotoxicity screens using an 87-compound library. *Toxicol. Sci.* 167, 15–25. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy180>
- Halder, M., Léonard, M., Iguchi, T., Oris, J.T., Ryder, K., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Embry, M.R., Whale, G., Norberg-King, T., Lillicrap, A., 2010. Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 6, 484–491. <https://doi.org/10.1002/ieam.48>
- Hallare, A., Nagel, K., Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.006>
- Hallare, A.V., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere* 56, 659–666. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.007>
- Hamdoune, M., Duclos, S., Mounie, J., Santona, L., Lhuguenot, J.C., Magdalou, J., Goudonnet, H., 1995. *In vitro* glucuronidation of peroxisomal proliferators: 2-Ethylhexanoic acid enantiomers and their structural analogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131, 235–243. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1066>
- Hanslick, J.L., Lau, K., Noguchi, K.K., Olney, J.W., Charles, F., Mennerick, S., Farber, N.B., 2009. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol. Dis.* 34, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.006>
- Harding, J.D., 2017. Nonhuman primates and translational research: Progress, opportunities, and challenges. *ILAR J.* 58, 141–150. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilx033>
- He, J.-H., Gao, J.-M., Huang, C.-J., Li, C.-Q., 2014. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 42, 35–42.

<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.01.006>

- Henn, K., Braunbeck, T., 2011. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 153, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.09.003>
- Hernandez, R.E., Galitan, L., Cameron, J., Goodwin, N., Ramakrishnan, L., 2018. Delay of initial feeding of zebrafish larvae until 8 days post fertilization has no impact on survival or growth through the juvenile stage. *Zebrafish* 15, 515–518. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1579>
- Hirano, T., Yanai, S., Takada, T., Yoneda, N., Omotehara, T., Kubota, N., Minami, K., Yamamoto, A., Mantani, Y., Yokoyama, T., Kitagawa, H., Hoshi, N., 2018. NOAEL-dose of a neonicotinoid pesticide, clothianidin, acutely induce anxiety-related behavior with human-audible vocalizations in male mice in a novel environment. *Toxicol. Lett.* 282, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.010>
- Hoelting, L., Klima, S., Karreman, C., Grinberg, M., Meisig, J., Henry, M., Rotshteyn, T., Rahnenführer, J., Blüthgen, N., Sachinidis, A., Waldmann, T., Leist, M., 2016. Stem cell-derived immature human dorsal root ganglia neurons to identify peripheral neurotoxicants. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 476–487. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0108>
- Hong, Y.L., Hossler, P.A., Calhoun, D.H., Meshnick, S.R., 1995. Inhibition of recombinant *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthetase by sulfa drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1756–1763. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.8.1756>
- Horie, Y., Yamagishi, T., Takahashi, H., Shintaku, Y., Iguchi, T., Tatarazako, N., 2017. Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. *J. Appl. Toxicol.* 37, 1245–1253. <https://doi.org/10.1002/jat.3487>
- Horzmann, K., Freeman, J., 2016. Zebrafish get Connected: investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity. *Toxics* 4, 19. <https://doi.org/10.3390/toxics4030019>
- Horzmann, K.A., Freeman, J.L., 2018. Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicol. Sci.* 163, 5–12. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy044>
- Howe, K., Clark, M., Torroja, C., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Al, E., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Huang, M., Jiao, J., Wang, J., Xia, Z., Zhang, Y., 2018. Characterization of acrylamide-induced oxidative stress and cardiovascular toxicity in zebrafish embryos. *J. Hazard. Mater.* 347, 451–460. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.016>
- Huang, Y., Zhang, J., Han, X., Huang, T., 2014. The Use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 3650–3660. <https://doi.org/10.3390/ijerph110403650>
- Hurt, M.E., Cappon, G.D., Browning, A., 2003. Proposal for a tiered approach to developmental toxicity testing for veterinary pharmaceutical products for food-producing animals. *Food Chem. Toxicol.* 41, 611–619. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00326-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00326-5)

- Iannaccone, P.M., Jacob, H.J., 2009. Rats! Dis. Model. Mech. 2, 206–210.  
<https://doi.org/10.1242/dmm.002733>
- ICH, 1993. ICH harmonized tripartite guideline. Detection of toxicity to reproduction for medical products & toxicity to male fertility S5.
- Ichikawa, Y., Yamanaka, Y., Suzuki, N., Naruchi, T., Kobayashi, O., Tsuruta, H., 1979. A new process for the production of trimethylhydroquinone. Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 18, 373–375. <https://doi.org/10.1021/i360072a029>
- Incardona, J.P., Scholz, N.L., 2016. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. Aquat. Toxicol. 177, 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.016>
- Inoue, A., Nishimura, Y., Matsumoto, N., Umemoto, N., Shimada, Y., Maruyama, T., Kayasuga, K., Morihara, M., Katagi, J., Shiroya, T., Hirota, Y., Kim, S., Tanaka, T., 2016. Comparative study of the zebrafish embryonic toxicity test and mouse embryonic stem cell test to screen developmental toxicity of human pharmaceutical drugs. Fundam. Toxicol. Sci. 3, 79–87. <https://doi.org/10.2131/fts.3.79>
- IQWiG, 2016. Institute for quality and efficiency in health care: Causes and signs of edema [WWW Document]. InformedHealth.org. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279409/> (zugegriffen 10.12.20).
- Isales, G.M., Hipszer, R.A., Raftery, T.D., Chen, A., Stapleton, H.M., Volz, D.C., 2015. Triphenyl phosphate-induced developmental toxicity in zebrafish: Potential role of the retinoic acid receptor. Aquat. Toxicol. 161, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.009>
- Isenberg, J.S., Jia, Y., Field, L., Ridnour, L.A., Sparatore, A., Soldato, P., Sowers, A.L., Yeh, G.C., Moody, T.W., Wink, D.A., Ramchandran, R., Roberts, D.D., 2007. Modulation of angiogenesis by dithiolethione-modified NSAIDs and valproic acid. Br. J. Pharmacol. 151, 142–151. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707198>
- Issa, O., Hassoun, E.A., Williams, F.E., 2019. Developmental effects of trichloroacetate in zebrafish embryos: Association with the production of superoxide anion. J. Biochem. Mol. Toxicol. 33, 1–6. <https://doi.org/10.1002/jbt.22259>
- Jálová, V., Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Ocelka, T., Grabic, R., Jurčíková, J., Vrana, B., Hilscherová, K., 2013. Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. Environ. Int. 59, 372–83. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.024>
- Jamkhande, P.G., Chintawar, K.D., Chandak, P.G., 2014. Teratogenicity: A mechanism based short review on common teratogenic agents. Asian Pacific J. Trop. Dis. 4, 421–432. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60600-9](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60600-9)
- Jarque, S., Rubio-Brotons, M., Ibarra, J., Ordoñez, V., Dyballa, S., Miñana, R., Terriente, J., 2020. Morphometric analysis of developing zebrafish embryos allows predicting teratogenicity modes of action in higher vertebrates. Reprod. Toxicol. 96, 337–348. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.004>
- Jeffries, M.K.S., Stultz, A.E., Smith, A.W., Stephens, D.A., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Oris, J.T., 2015. The fish embryo toxicity test as a replacement for the larval growth and survival test: A comparison of test sensitivity and identification of alternative endpoints in zebrafish and fathead minnows. Environ. Toxicol. Chem. 34, 1369–1381. <https://doi.org/10.1002/etc.2932>

- Jokanovic, M., 2009. Neuropathy: Chemically-induced. *Encycl. Neurosci.* 759–765. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00515-5>
- Jorgenebert, L., Derkenne, S., Nebert, D., 2007. Drugs and the mouse pharmacology, pharmacogenetics, and pharmacogenomics, in: *The Mouse in Biomedical Research*. Elsevier, S. 289–320. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50028-5>
- Jung, K.H., Das, N.D., Park, J.H., Lee, H.T., Choi, M.R., Chung, M.K., Park, K.S., Jung, M.H., Lee, B.C., Choi, I.G., Chai, Y.G., 2010. Effects of acute ethanol treatment on NCCIT cells and NCCIT cell-derived embryoid bodies (EBs). *Toxicol. Vitro*. 24, 1696–1704. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.017>
- Kagawa, N., Nagao, T., 2018. Neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to acetamiprid. *J. Appl. Toxicol.* 38, 1521–1528. <https://doi.org/10.1002/jat.3692>
- Kais, B., Schiwy, S., Hollert, H., Keiter, S.H., Braunbeck, T., 2017. In vivo EROD assays with the zebrafish (*Danio rerio*) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity. *Sci. Total Environ.* 590–591, 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.236>
- Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T., 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquat. Toxicol.* 140–141, 229–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.022>
- Kais, B., Stengel, D., Batel, A., Braunbeck, T., 2015. Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16329–16339. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4014-1>
- Kalueff, A. V., Stewart, A.M., Gerlai, R., Court, P., 2014. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- Kamstra, J.H., Aleström, P., Kooter, J.M., Legler, J., 2015. Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16262–16276. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3466-7>
- Kanungo, J., Cuevas, E., Ali, S., Paule, M., 2014. Zebrafish model in drug safety assessment. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5416–5429. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205145658>
- Kappel, S., Hawkins, P., Mendl, M., 2017. To group or not to group? Good practice for housing male laboratory mice. *Animals* 7, 88. <https://doi.org/10.3390/ani7120088>
- Kara, M., Yumrutas, O., Demir, C.F., Ozdemir, H.H., Bozgeyik, I., Coskun, S., Eraslan, E., Bal, R., 2015. Insecticide imidacloprid influences cognitive functions and alters learning performance and related gene expression in a rat model. *Int. J. Exp. Pathol.* 96, 332–7. <https://doi.org/10.1111/iep.12139>
- Kawata, Y., Okada, M., Murakami, T., Kamata, A., Zhu, G., Kaneko, S., 2001. Pharmacological discrimination between effects of carbamazepine on hippocampal basal, Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-evoked serotonin release. *Br. J. Pharmacol.* 133, 557–567. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704104>
- Kennedy, G.L., 2012. Alkylpyridines and miscellaneous organic nitrogen compounds, in: Bingham, E., Cohrssen, E., Powell, C.H. (Hrsg.), *Patty's Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, S. 1–158. <https://doi.org/10.1002/0471435139.tox060.pub2>

- Kim, D.-J., Seok, S.-H., Baek, M.-W., Lee, H.-Y., Na, Y.-R., Park, S.-H., Lee, H.-K., Dutta, N.K., Kawakami, K., Park, J.-H., 2009. Developmental toxicity and brain aromatase induction by high genistein concentrations in zebrafish embryos. *Toxicol. Mech. Methods* 19, 251–256. <https://doi.org/10.1080/15376510802563330>
- Kim, K.-T., Tanguay, R.L., 2014. The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in the embryonic zebrafish assay. *Environ. Health Toxicol.* 29, e2014021. <https://doi.org/10.5620/eht.e2014021>
- Kimbrough, R.D., 1971. Review of the toxicity of hexachlorophene. *Arch. Environ. Heal. An Int. J.* 23, 119–122.
- Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B., Schilling, T., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Am. J. Anat.* 203, 253–310.
- Kitamura, S., Miyata, C., Tomita, M., Date, S., Kojima, T., Minamoto, H., Kurimoto, S., Noguchi, Y., Nakagawa, R., 2020. A central nervous system disease of unknown cause that occurred in the minamata region: Results of an epidemiological study. *J. Epidemiol.* 30, 3–11. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20190173>
- Klüver, N., König, M., Ortmann, J., Massei, R., Paschke, A., Kühne, R., Scholz, S., 2015. Fish embryo toxicity test: Identification of compounds with weak toxicity and analysis of behavioral effects to improve prediction of acute toxicity for neurotoxic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 49, 7002–7011. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01910>
- Klüver, N., Ortmann, J., Paschke, H., Renner, P., Ritter, A.P., Scholz, S., 2014. Transient overexpression of *adh8a* increases allyl alcohol toxicity in zebrafish embryos. *PLoS One* 9, e90619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090619>
- Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, Á., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S., 2012. Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: Relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9690–9700. <https://doi.org/10.1021/es301729q>
- Kokel, D., Dunn, T.W., Ahrens, M.B., Alshut, R., Cheung, C.Y.J., Saint-Amant, L., Bruni, G., Mateus, R., van Ham, T.J., Shiraki, T., Fukada, Y., Kojima, D., Yeh, J.R.J., Mikut, R., von Lintig, J., Engert, F., Peterson, R.T., 2013. Identification of nonvisual photomotor response cells in the vertebrate hindbrain. *J. Neurosci.* 33, 3834–3843. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3689-12.2013>
- Kolaja, G.J., Hinton, D.E., 1977. Effects of DDT on eggshell quality and calcium adenosine triphosphatase. *J. Toxicol. Environ. Health* 3, 699–704. <https://doi.org/10.1080/15287397709529604>
- Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R., Prevarskaya, N., 2015. Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848, 2532–2546. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.030>
- Kong, Y., Grimaldi, M., Curtin, E., Dougherty, M., Kaufman, C., White, R.M., Zon, L.I., Liao, E.C., 2014. Neural crest development and craniofacial morphogenesis is coordinated by nitric oxide and histone acetylation. *Chem. Biol.* 21, 488–501. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.02.013>
- Kozikowski, B.A., Burt, T.M., Tirey, D.A., Williams, L.E., Kuzmak, B.R., Stanton, D.T., Morand, K.L., Nelson, S.L., 2003. The effect of freeze/thaw cycles on the stability of compounds in DMSO. *J. Biomol. Screen.* 8, 210–215. <https://doi.org/10.1177/1087057103252618>

- Krebs, A., Nyffeler, J., Karreman, C., Schmidt, B.Z., Kappenberg, F., Mellert, J., Pallocca, G., Pastor, M., Rahnenführer, J., Leist, M., 2020. Determination of benchmark concentrations and their statistical uncertainty for cytotoxicity test data and functional in vitro assays. *ALTEX Altern. zu Tierexperimenten* 37, 155–163. <https://doi.org/10.14573/altex.1912021>
- Krebs, Alice, van Vugt-Lussenburg, B.M.A., Waldmann, T., Albrecht, W., Boei, J., ter Braak, B., Brajnik, M., Braunbeck, T., Brecklinghaus, T., Busquet, F., Dinnyes, A., Dokler, J., Dolde, X., Exner, T.E., Fisher, C., Fluri, D., Forsby, A., Hengstler, J.G., Holzer, A.-K., Janstova, Z., Jennings, P., Kisitu, J., Kobolak, J., Kumar, M., Limonciel, A., Lundqvist, J., Mihalik, B., Moritz, W., Pallocca, G., Ulloa, A.P.C., Pastor, M., Rovida, C., Sarkans, U., Schimming, J.P., Schmidt, B.Z., Stöber, R., Strassfeld, T., van de Water, B., Wilmes, A., van der Burg, B., Verfaillie, C.M., von Hellfeld, R., Vrieling, H., Vrijenhoek, N.G., Leist, M., 2020. The EU-ToxRisk method documentation, data processing and chemical testing pipeline for the regulatory use of new approach methods. *Arch. Toxicol.* 94, 2435–2461. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02802-6>
- Krieger, R. (Hrsg.), 2001. *Handbook of pesticide toxicology*, 2. ed. Academic Press, San Diego, California.
- Krug, A.K., Balmer, N. V., Matt, F., Schönenberger, F., Merhof, D., Leist, M., 2013. Evaluation of a human neurite growth assay as specific screen for developmental neurotoxicants. *Arch. Toxicol.* 87, 2215–2231. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1072-y>
- Kumar, S., Porcu, P., Werner, D.F., Matthews, D.B., Diaz-Granados, J.L., Helfand, R.S., Morrow, A.L., 2009. The role of GABA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: A decade of progress. *Psychopharmacology (Berl.)* 205, 529–564. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1562-z>
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere* 75, 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Küster, A., Adler, N., 2014. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130587. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0587>
- Kuwagata, M., Ogawa, T., Shioda, S., Nagata, T., 2009. Observation of fetal brain in a rat valproate-induced autism model: a developmental neurotoxicity study. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.01.006>
- Labonty, M., Pray, N., Yelick, P.C., 2017. A zebrafish model of human fibrodysplasia ossificans progressiva. *Zebrafish* 14, 293–304. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1398>
- Lajis, A.F.B., 2018. A zebrafish embryo as an animal model for the treatment of hyperpigmentation in cosmetic dermatology medicine. *Medicina (B. Aires.)* 54, 35. <https://doi.org/10.3390/medicina54030035>
- 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. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>
- Laville, N., Ait-Ässa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.11.002>

- Laws, E., 2013. *Environmental Toxicology*, 1. ed. Springer-Verlag New York, New York.
- Lazic, S.E., Grote, H.E., Blakemore, C., Hannan, A.J., van Dellen, A., Phillips, W., Barker, R.A., 2006. Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1829–1838. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04715.x>
- Le Couteur, D.G., McLean, A.J., Taylor, M.C., Woodham, B.L., Board, P.G., 1999. Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother.* 53, 122–130. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(99\)80077-8](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(99)80077-8)
- Ledent, V., 2002. Postembryonic development of the posterior lateral line in the zebrafish. *Development* 129, 597–604. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00346.x>
- Lee, J.S., Morita, Y., Kawai, Y.K., Covaci, A., Kubota, A., 2020. Developmental circulatory failure caused by metabolites of organophosphorus flame retardants in zebrafish, *Danio rerio*. *Chemosphere* 246, 125738. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125738>
- Lee, K.J., Nallathamby, P.D., Browning, L.M., Osgood, C.J., Xu, X.-H.N., 2007. *In vivo* imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano* 1, 133–143. <https://doi.org/10.1021/nn700048y>
- Legradi, J., el Abdellaoui, N., van Pomeran, M., Legler, J., 2015. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 16277–16289. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3805-8>
- Leonard, J.P., Salpeter, M.M., 1979. Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium. *J. Cell Biol.* 82, 811–819. <https://doi.org/10.1083/jcb.82.3.811>
- Lessard, M., Herst, P.M., Charest, P.L., Navarro, P., Joly-Beauparlant, C., Droit, A., Kimmins, S., Trasler, J., Benoit-Biancamano, M.-O., MacFarlane, A.J., Dalvai, M., Bailey, J.L., 2019. Prenatal exposure to environmentally-relevant contaminants perturbs male reproductive parameters across multiple generations that are partially protected by folic acid supplementation. *Sci. Rep.* 9, 13829. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50060-z>
- Letcher, R.J., Bustnes, J.O., Dietz, R., Jenssen, B.M., Jørgensen, E.H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M.M., Gabrielsen, G.W., 2010. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Sci. Total Environ.* 408, 2995–3043. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.038>
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., Robinson, J.P., 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* 278, 8516–8525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210432200>
- Li, R., Wang, H., Mi, C., Feng, C., Zhang, L., Yang, L., Zhou, B., 2019. The adverse effect of TCIPP and TCEP on neurodevelopment of zebrafish embryos/larvae. *Chemosphere* 220, 811–817. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.198>
- Li, V.W.T., Tsui, M.P.M., Chen, X., Hui, M.N.Y., Jin, L., Lam, R.H.W., Yu, R.M.K., Murphy, M.B., Cheng, J., Lam, P.K.S., Cheng, S.H., 2016. Effects of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) on neuronal and muscular development in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8275–8285.

<https://doi.org/10.1007/s11356-016-6180-9>

- Li, Y.X., Zdanowicz, M., Young, L., Kumiski, D., Leatherbury, L., Kirby, M.L., 2003. Cardiac neural crest in zebrafish embryos contributes to myocardial cell lineage and early heart function. *Dev. Dyn.* 226, 540–550. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10264>
- Lim, S.Y., Tyan, Y.-S., Chao, Y.-P., Nien, F.-Y., Weng, J.-C., 2015. New insights into the developing rabbit brain using diffusion tensor tractography and generalized q-sampling MRI. *PLoS One* 10, e0119932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119932>
- Limonciel, A., Aschauer, L., Wilmes, A., Prajczek, S., Leonard, M.O., Pfaller, W., Jennings, P., 2011. Lactate is an ideal non-invasive marker for evaluating temporal alterations in cell stress and toxicity in repeat dose testing regimes. *Toxicol. Vitro* 25, 1855–1862. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.018>
- Lin, C.C., Hui, M.N.Y., Cheng, S.H., 2007. Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.04.013>
- Lin, S., 2002. The zebrafish as a model for human disease. *Front. Biosci.* 7, A851. <https://doi.org/10.2741/A851>
- Lisse, T.S., Middleton, L.J., Pellegrini, A.D., Martin, P.B., Spaulding, E.L., Lopes, O., Brochu, E.A., Carter, E. V., Waldron, A., Rieger, S., 2016. Paclitaxel-induced epithelial damage and ectopic MMP-13 expression promotes neurotoxicity in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 2189–2198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525096113>
- Liu, X., Jung, D., Jo, A., Ji, K., Moon, H.B., Choi, K., 2016. Long-term exposure to triphenylphosphate alters hormone balance and HPG, HPI, and HPT gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2288–2296. <https://doi.org/10.1002/etc.3395>
- Liu, X., Zhang, Q., Li, S., Mi, P., Chen, D., Zhao, X., Feng, X., 2018. Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. *Chemosphere* 199, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.176>
- Llansola, M., Piedrafita, Á.B., Rodrigo, Á.R., Montoliu, Á.C., Felipo, Á.V., 2009. Polychlorinated biphenyls PCB 153 and PCB 126 impair the glutamate- nitric oxide- CgmpGlutamate – nitric oxide – cGMP pathway in cerebellar neurons in culture by different mechanisms. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 813–820. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9055-8>
- LoPachin, R.M., Gavin, T., 2008. Acrylamide-Induced Nerve Terminal Damage: Relevance to Neurotoxic and Neurodegenerative Mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5994–6003. <https://doi.org/10.1021/jf703745t>
- Lords, H. of, 2002. Animals in scientific procedures.
- Lörracher, A.-K., Braunbeck, T., 2020. Inducibility of cytochrome P450-mediated 7-methoxycoumarin-O-demethylase activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 225, 105540. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105540>
- Lotharius, J., 2005. Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress Is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. *J. Neurosci.* 25, 6329–6342. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1746-05.2005>

- Lovinger, D.M., 1999. 5-HT<sub>3</sub> receptors and the neural actions of alcohols: An increasingly exciting topic. *Neurochem. Int.* 35, 125–130. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00054-6)
- Lowery, L.A., Sive, H., 2004. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech. Dev.* 121, 1189–1197.
- Lu, Z., Desmidt, A.A., 2013. Early development of hearing in zebrafish. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 14, 509–521. <https://doi.org/10.1007/s10162-013-0386-z>
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711–747. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>
- Ma, X., Li, H., Xiong, J., Mehler, W.T., You, J., 2019. Developmental toxicity of a neonicotinoid insecticide, acetamiprid to zebrafish embryos. *J. Agric. Food Chem.* 67, 2429–2436. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05373>
- Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, O.E., de Witte, P.A.M., Esguerra, C. V., Crawford, A.D., 2012. Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. *PLoS One* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043850>
- Mahatthanatrakul, W., Nontaput, T., Ridditid, W., Wongnawa, M., Sunbhanich, M., 2007. Rifampin, a cytochrome P450 3A inducer, decreases plasma concentrations of antipsychotic risperidone in healthy volunteers. *J. Clin. Pharm. Ther.* 32, 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2007.00811.x>
- Maitre, M., Ciesbelski, L., Mandel, P., 1974. Effect of 2-methyl 2-ethyl caproic acid and 2-2-dimethyl valeric acid on audiogenic seizures and brain gamma aminobutyric acid. *Biochem. Pharmacol.* 23, 2363–2368. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90225-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90225-1)
- Maloney, E.K., Waxman, D.J., 1999. trans-Activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161, 209–218. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8809>
- Mandal, P.K., 2005. Dioxin: A review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 175, 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0483-3>
- Mangipudy, R., Burkhardt, J., Kadambi, V.J., 2014. Use of animals for toxicology testing is necessary to ensure patient safety in pharmaceutical development. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70, 439–441. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.07.014>
- Manjunatha, B., Han, L., Kundapur, R.R., Liu, K., Lee, S.J., 2020. Herbul black henna (hair dye) causes cardiovascular defects in zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 14150–14159. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07762-z>
- Manninen, A., Kröger, S., Liesivuori, J., Savolainen, H., 1989. 2-Ethylhexanoic acid inhibits urea synthesis and stimulates carnitine acetyltransferase activity in rat liver mitochondria. *Arch. Toxicol.* 63, 160–161. <https://doi.org/10.1007/BF00316441>
- Martin-Bouyer, G., Toga, M., Lebreton, R., Stolley, P.D., Lockhart, J., 1982. Outbreak of accidental hexachlorophene poisoning in France. *Lancet* 319, 91–95. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)90225-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)90225-2)
- Martinez, M.N., Antonovic, L., Court, M., Dacasto, M., Fink-Gremmels, J., Kukanich, B., Locuson, C., Mealey, K., Myers, M.J., Trepanier, L., 2013. Challenges in

- exploring the cytochrome P450 system as a source of variation in canine drug pharmacokinetics. *Drug Metab. Rev.* 45, 218–230.  
<https://doi.org/10.3109/03602532.2013.765445>
- Martínez, R., Herrero-Nogareda, L., Van Antro, M., Campos, M.P., Casado, M., Barata, C., Piña, B., Navarro-Martín, L., 2019. Morphometric signatures of exposure to endocrine disrupting chemicals in zebrafish eleutheroembryos. *Aquat. Toxicol.* 214, 105232. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105232>
- Martyniuk, C.J., Mehinto, A.C., Denslow, N.D., 2020. Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 507, 110764. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110764>
- Massa, V., Cabrera, R.M., Menegola, E., Giavini, E., Finnell, R.H., 2005. Valproic acid-induced skeletal malformations: associated gene expression cascades. *Pharmacogenet. Genomics* 15, 787–800.  
<https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000170914.11898.3a>
- Matson, C.W., Timme-Laragy, A.P., Di Giulio, R.T., 2008. Fluoranthene, but not benzo[a]pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish. *Chemosphere* 74, 129–154.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Matthiessen, P., Wheeler, J.R., Weltje, L., 2018. A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. *Crit. Rev. Toxicol.* 48, 195–216. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1397099>
- Matturri, L., Ottaviani, G., Ramos, S.G., Rossi, L., 2000. Sudden Infant Death Syndrome (SIDS): a study of cardiac conduction system. *Cardiovasc. Pathol.* 9, 137–145.  
[https://doi.org/10.1016/S1054-8807\(00\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S1054-8807(00)00035-1)
- McCallum, L., Lip, S., Padmanabhan, S., 2015. The hidden hand of chloride in hypertension. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 467, 595–603.  
<https://doi.org/10.1007/s00424-015-1690-8>
- McGrath, P., Li, C.Q., 2008. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov. Today* 13, 394–401.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.03.002>
- Melvin, S.D., Wilson, S.P., 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: A meta-analysis. *Chemosphere* 93, 2217–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.036>
- Mendis, J.C., Tennakoon, T.K., Jayasinghe, C.D., 2018. Zebrafish embryo toxicity of a binary mixture of pyrethroid insecticides: d-Tetramethrin and cyphenothrin. *J. Toxicol.* 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/4182694>
- Meneghetti, G., Skobo, T., Chrisam, M., Fontana, C.M., Facchinello, N., Nazio, F., Cecconi, F., Bonaldo, P., Dalla Valle, L., 2020. Zebrafish *ambra1a* and *ambra1b* silencing affect heart development. *Zebrafish* 17, 163–176.  
<https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1860>
- Menegola, E., Di Renzo, F., Broccia, M.L., Prudenziati, M., Minucci, S., Massa, V., Giavini, E., 2005. Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 74, 392–398. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20053>
- Menelaou, E., Udvardia, A.J., Tanguay, R.L., Svoboda, K.R., 2014. Activation of  $\alpha 2A$ -containing nicotinic acetylcholine receptors mediates nicotine-induced motor output

- in embryonic zebrafish. *Eur. J. Neurosci.* 40, 2225–2240.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.12591>
- Menke, A.L., Spitsbergen, J.M., Wolterbeek, A.P.M., Woutersen, R.A., 2011. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol. Pathol.* 39, 759–775.  
<https://doi.org/10.1177/0192623311409597>
- Meyer, D.C., Carr, L.A., 1987. The effects of perinatal exposure to nicotine on plasma LH levels in prepubertal rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 9, 95–98.  
[https://doi.org/10.1016/0892-0362\(87\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0892-0362(87)90084-5)
- Miller, G.W., Chandrasekaran, V., Yaghoobi, B., Lein, P.J., 2018. Opportunities and challenges for using the zebrafish to study neuronal connectivity as an endpoint of developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology* 67, 102–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.04.016>
- Molina, G., Vogt, A., Bakan, A., Dai, W., De, P.Q., Znosko, W., Smithgall, T.E., Bahar, I., Lazo, J.S., Billy, W., 2010. Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages. *Nat. Chem. Biol.* 5, 680–687.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.190.Zebrafish>
- Monticello, T.M., Jones, T.W., Dambach, D.M., Potter, D.M., Bolt, M.W., Liu, M., Keller, D.A., Hart, T.K., Kadambi, V.J., 2017. Current nonclinical testing paradigm enables safe entry to First-In-Human clinical trials: The IQ consortium nonclinical to clinical translational database. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 334, 100–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.09.006>
- Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., Tyler, C.R., 2017. Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12796–12805.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03283>
- Morris, A.C., Fadool, J.M., 2005. Studying rod photoreceptor development in zebrafish. *Physiol. Behav.* 86, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.020>
- Morrison, M., Klein, C., Clemann, N., Collier, D.A., Hardy, J., Heißerer, B., Cader, M.Z., Graf, M., Kaye, J., 2015. StemBANCC: Governing access to material and data in a large stem cell research consortium. *Stem Cell Rev. Reports* 11, 681–687.  
<https://doi.org/10.1007/s12015-015-9599-3>
- Mosier, H.D., Armstrong, M.K., 1964. Effects of maternal intake of nicotine on fetal and newborn rats. *Exp. Biol. Med.* 116, 956–958. <https://doi.org/10.3181/00379727-116-29419>
- Murko, C., Lagger, S., Steiner, M., Seiser, C., Schoefer, C., Pusch, O., 2013. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces neural tube defects and promotes neural crest specification in the chicken neural tube. *Differentiation* 85, 55–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.12.001>
- Muzylak, M., Maslinska, D., 1992. Neurotoxic effect of nicristine on ultrastructure of hypothalamus in rabbits. *Folia Histochem. Cytobiol.* 30, 113–117.
- National Center for Biotechnology Information, 2020. PubChem compound summary for CID 16760674, Taxol (R) [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Taxol> (zugegriffen 8.3.20).
- National Research Council, 1977. *Drinking Water & Health*, Volume 1. ed. National Academy Press, Washington, DC.

- National Research Council, Institute of Medicine, 1988. Chapter 3: Benefits derived from the use of animals, in: Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research. National Academies Press.
- Nau, H., 1986. Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis. *Environ. Health Perspect.* 70, 113–129. <https://doi.org/10.1289/ehp.8670113>
- Neale, P.A., Altenburger, R., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Busch, W., de Aragão Umbuzeiro, G., Denison, M.S., Du Pasquier, D., Hilscherová, K., Hollert, H., Morales, D.A., Novák, J., Schlichting, R., Seiler, T.B., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Williams, T.D., Escher, B.I., 2017. Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.016>
- Newman, M.C., Clements, W.H., 1998. *Ecotoxicology: A comprehensive treatment*. CRC Press.
- Ni, J., Wang, H., Wei, X., Shen, K., Sha, Y., Dong, Y., Shu, Y., Wan, X., Cheng, J., Wang, F., Liu, Y., 2020. Isoniazid causes heart looping disorder in zebrafish embryos by the induction of oxidative stress. *BMC Pharmacol. Toxicol.* <https://doi.org/10.1186/s40360-020-0399-2>
- Nie, Z.-W., Niu, Y.-J., Zhou, W., Kim, Y.-H., Shin, K.-T., Cui, X.-S., 2019. Thiamethoxam inhibits blastocyst expansion and hatching via reactive-oxygen species-induced G2 checkpoint activation in pigs. *Cell. Signal.* 53, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.08.014>
- Nishide, Y., Tanaka, S., 2016. Desert locust, *Schistocerca gregaria*, eggs hatch in synchrony in a mass but not when separated. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70, 1507–1515. <https://doi.org/10.1007/s00265-016-2159-2>
- Nishimura, H., Nakai, K., 1958. Developmental anomalies in offspring of pregnant mice treated with nicotine. *Science* (80- ). 127, 877–878. <https://doi.org/10.1126/science.127.3303.877>
- Nishimura, Y., Inoue, A., Sasagawa, S., Koiwa, J., Kawaguchi, K., Kawase, R., Maruyama, T., Kim, S., Tanaka, T., 2016. Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 56, 18–27. <https://doi.org/10.1111/cga.12142>
- Nishimura, Y., Murakami, S., Ashikawa, Y., Sasagawa, S., Umemoto, N., Shimada, Y., Tanaka, T., 2015. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 55, 1–16. <https://doi.org/10.1111/cga.12079>
- Nunoya, T., Shibuya, K., Saitoh, T., Yazawa, H., Nakamura, K., Baba, Y., Hirai, T., 2007. Use of miniature pig for biomedical research, with reference to toxicologic studies. *J. Toxicol. Pathol.* 20, 125–132. <https://doi.org/10.1293/tox.20.125>
- Nyffeler, J., Chovancova, P., Dolde, X., Holzer, A.-K., Purvanov, V., Kindinger, I., Kerins, A., Higton, D., Silvester, S., van Vugt-Lussenburg, B.M.A., Glaab, E., van der Burg, B., MacLennan, R., Legler, D.F., Leist, M., 2018. A structure–activity relationship linking non-planar PCBs to functional deficits of neural crest cells: new roles for connexins. *Arch. Toxicol.* 92, 1225–1247. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2125-4>
- Nyffeler, J., Dolde, X., Krebs, A., Pinto-Gil, K., Pastor, M., Behl, M., Waldmann, T., Leist, M., 2017a. Combination of multiple neural crest migration assays to identify

- environmental toxicants from a proof-of-concept chemical library. *Arch. Toxicol.* 91, 3613–3632. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1977-y>
- Nyffeler, J., Karreman, C., Leisner, H., Kim, Y.J., Lee, G., Waldmann, T., Leist, M., 2017b. Design of a high-Throughput human neural crest cell migration assay to indicate potential developmental toxicants. *ALTEX Altern. zu Tierexperimenten* 34, 75–94. <https://doi.org/10.14573/altex.1605031>
- OECD, 2019a. OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 415: One-Generation Reproduction Toxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation for Economic Co-operation and Development. <https://doi.org/10.1787/9789264070844-en>
- OECD, 2019b. OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Organisation of Economic Development. <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- OECD, 2013. OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Organisation of Economic Development. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- OECD, 2012. Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test (No. 179).
- OECD, 2011. Validation report (Phase I) for the zebrafish embryo toxicity test part I (OECD TG 157).
- OECD, 2007. OECD guidelines for the testing fo chemicals. Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation of Economic Development. <https://doi.org/10.1787/9789264067394-en>
- OECD, 2000. OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Organisation of Economic Development. <https://doi.org/10.1787/9789264070202-en>
- OECD, 1996. OECD guideline for testing of chemicals. Test No. 422: Combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test.
- OECD, 1995. OECD guideline for testing of chemicals. Test No 421: Reproduction/developmental toxicity screening test.
- OECD, 1983. OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation for Economic Co-operation and Development. <https://doi.org/10.1787/9789264070868-en>
- OECD, 1981a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1. Organisation of Economic Development. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/72d77764-en>
- OECD, 1981b. OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 414 Prenatal developmental toxicity study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation of Economic Development. <https://doi.org/10.1787/9789264070820-en>
- Ogungbemi, A., Leuthold, D., Scholz, S., Küster, E., 2019. Hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how

- experimental parameters impact the predictability of behavior changes. *Environ. Sci. Eur.* 31, 88. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0270-5>
- Ohno, S., Ikenaka, Y., Onaru, K., Kubo, S., Sakata, N., Hirano, T., Mantani, Y., Yokoyama, T., Takahashi, K., Kato, K., Arizono, K., Ichise, T., Nakayama, S.M.M., Ishizuka, M., Hoshi, N., 2020. Quantitative elucidation of maternal-to-fetal transfer of neonicotinoid pesticide clothianidin and its metabolites in mice. *Toxicol. Lett.* 322, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.01.003>
- Oliveira, R., Domingues, I., Koppe Grisolia, C., Soares, A.M.V.M., 2009. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 679–688. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0119-3>
- Osterauer, R., Köhler, H.R.H.-R., 2008. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 86, 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.013>
- Özdemir, H.H., Kara, M., Yumrutas, O., Uckardes, F., Eraslan, E., Demir, C.F., Bal, R., 2014. Determination of the effects on learning and memory performance and related gene expressions of clothianidin in rat models. *Cogn. Neurodyn.* 8, 411–416. <https://doi.org/10.1007/s11571-014-9293-1>
- Padilla, S., Corum, D., Padnos, B., Hunter, D.L., Beam, A., Houck, K.A., Sipes, N., Kleinstreuer, N., Knudsen, T., Dix, D.J., Reif, D.M., 2012. Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. *Reprod. Toxicol.* 33, 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.10.018>
- Padilla, S., Hunter, D.L., Padnos, B., Frady, S., MacPhail, R.C., 2011. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.08.005>
- Palmér, T., Ek, F., Enqvist, O., Olsson, R., Åström, K., Petersson, P., 2017. Action sequencing in the spontaneous swimming behavior of zebrafish larvae - implications for drug development. *Sci. Rep.* 7, 3191. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03144-7>
- Palpant, N.J., Hofsteen, P., Pabon, L., Reinecke, H., Murry, C.E., 2015. Cardiac development in zebrafish and human embryonic stem cells is inhibited by exposure to tobacco cigarettes and e-cigarettes. *PLoS One* 10, e0126259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126259>
- Panula, P., Chen, Y.C., Priyadarshini, M., Kudo, H., Semenova, S., Sundvik, M., Sallinen, V., 2010. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol. Dis.* 40, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.010>
- Panzica-Kelly, J.M., Zhang, C.X., Augustine-Rauch, K.A., 2015. Optimization and performance assessment of the chorion-off [dechorinated] zebrafish developmental toxicity assay. *Toxicol. Sci.* 146, 127–134. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv076>
- Papke, R.L., Ono, F., Stokes, C., Urban, J.M., Boyd, R.T., 2012. The nicotinic acetylcholine receptors of zebrafish and an evaluation of pharmacological tools used for their study. *Biochem. Pharmacol.* 84, 352–365. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.04.022>
- Parker, B., Connaughton, V.P., 2007. Effects of nicotine on growth and development in larval zebrafish. *Zebrafish* 4, 59–68. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9994>
- Parker, V.H., Barnes, J.M., Denz, F.A., 1951. Some observations on the toxic properties

- of 3,5-Dinitro-Ortho-Cresol. *Occup. Environ. Med.* 8, 226–235.  
<https://doi.org/10.1136/oem.8.4.226>
- Parng, C., Roy, N.M., Ton, C., Lin, Y., McGrath, P., 2007. Neurotoxicity assessment using zebrafish. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 55, 103–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.04.004>
- Parng, C., Ton, C., Lin, Y.-X., Roy, N.M., McGrath, P., 2006. A zebrafish assay for identifying neuroprotectants *in vivo*. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 509–516.  
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.04.003>
- Parsons, A., Lange, A., Hutchinson, T.H., Miyagawa, S., Iguchi, T., Kudoh, T., Tyler, C.R., 2019. Molecular mechanisms and tissue targets of brominated flame retardants, BDE-47 and TBBPA, in embryo-larval life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 209, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.022>
- Pascal-Lorber, S., Rathahao, E., Cravedi, J.P., Laurent, F., 2003. Uptake and metabolic fate of [14C]-2,4-dichlorophenol and [14C]-2,4-dichloroaniline in wheat (*Triticum aestivum*) and soybean (*Glycine max*). *J. Agric. Food Chem.* 51, 4712–4718.  
<https://doi.org/10.1021/jf034230j>
- Péan, S., Daouk, T., Vignet, C., Lyphout, L., Leguay, D., Loizeau, V., Bégout, M.-L., Cousin, X., 2013. Long-term dietary-exposure to non-coplanar PCBs induces behavioral disruptions in adult zebrafish and their offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 39, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.07.001>
- Pelka, K.E., Henn, K., Keck, A., Sapel, B., Braunbeck, T., 2017. Size does matter – Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 185, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.015>
- Pelster, B., Bagatto, B., 2010. Respiration, in: *Fish Physiology*. S. 289–309.  
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)02907-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)02907-9)
- Pennanen, S.M., Heiskanen, K.M., Savolainen, K.M., Komulainen, H., 2000. Effects of 2-ethylhexanoic acid on the production of reactive oxygen species in human polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 117, 79–84.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(00\)00243-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(00)00243-5)
- Pentšuk, N., van der Laan, J.W., 2009. An interspecies comparison of placental antibody transfer: New insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 86, 328–344.  
<https://doi.org/10.1002/bdrb.20201>
- Peterson, J.S.K., Bain, L.J., 2004. Differential gene expression in anthracene-exposed mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 66, 345–355.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.005>
- Peterson, R.T., Fishman, M.C., 2011. Designing zebrafish chemical screens. S. 525–541.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381320-6.00023-0>
- Petit, T.L., Biederman, G.B., Jonas, P., LeBoutillier, J.C., 1985. Neurobehavioral development following aluminum administration in infant rabbits. *Exp. Neurol.* 88, 640–651. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(85\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0014-4886(85)90077-9)
- Piersma, A.H., Ezendam, J., Luijten, M., Muller, J.J.A., Rorije, E., van der Ven, L.T.M., van Benthem, J., 2014. A critical appraisal of the process of regulatory implementation of novel *in vivo* and *in vitro* methods for chemical hazard and risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 876–894.

<https://doi.org/10.3109/10408444.2014.940445>

- Pillai, R., Coverdale, L.E., Dubey, G., Martin, C.C., 2004. Histone deacetylase 1 (HDAC-1) required for the normal formation of craniofacial cartilage and pectoral fins of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 231, 647–654. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20168>
- Pinho, B., Reis, S., Guedes-Dias, P., Leitão-Rocha, A., Quintas, C., Valentão, P., Andrade, P.B., Santos, M., Oliveira, J., 2016. Pharmacological modulation of HDAC1 and HDAC6 in vivo in a zebrafish model: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *Pharmacol. Res.* 103, 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.11.024>
- Plasterer, M.R., Bradshaw, W.S., Booth, G.M., Carter, M.W., Schuler, R.L., Hardin, B.D., 1985. Developmental toxicity of nine selected compounds following prenatal exposure in the mouse: Naphthalene, p -nitrophenol, sodium selenite, dimethyl phthalate, ethylenethiourea, and four glycol ether derivatives. *J. Toxicol. Environ. Health* 15, 25–38. <https://doi.org/10.1080/15287398509530633>
- Popovska-Gorevski, M., Dubocovich, M.L., Rajnarayanan, R. V., 2017. Carbamate insecticides target human melatonin receptors. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 574–582. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00301>
- Popper, A.N., Fay, R.R., 1973. Sound detection and processing by teleost fishes: a critical review. *J. Acoust. Sci. Am.* 53, 1515–29. <https://doi.org/10.1121/1.1913496>
- Powell, H., Swarner, O., Gluck, L., Lampert, P., 1973. Hexachlorophene myelinopathy in premature infants. *J. Pediatr.* 82, 976–981. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(73\)80428-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(73)80428-7)
- Prats, E., Gómez-Canela, C., Ben-Lulu, S., Ziv, T., Padrós, F., Tornero, D., Garcia-Reyero, N., Tauler, R., Admon, A., Raldúa, D., 2017. Modelling acrylamide acute neurotoxicity in zebrafish larvae. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14460-3>
- Puhl, A.C., Milton, F.A., Cvorov, A., Sieglaff, D.H., Campos, J.C.L., Bernardes, A., Filgueira, C.S., Lindemann, J.L., Deng, T., Neves, F.A.R., Polikarpov, I., Webb, P., 2015. Mechanisms of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  regulation by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nucl. Recept. Signal.* 13, nrs.13004. <https://doi.org/10.1621/nrs.13004>
- Pype, C., Verbueken, E., Saad, M.A., Casteleyn, C.R., Van Ginneken, C.J., Knapen, D., Van Cruchten, S.J., 2015. Incubation at 32.5°C and above causes malformations in the zebrafish embryo. *Reprod. Toxicol.* 56, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.006>
- Raldúa, D., André, M., Babin, P.J., 2008. Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228, 301–314. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.11.016>
- Raman, M., Ahmed, I., Gillevet, P.M., Probert, C.S., Ratcliffe, N.M., Smith, S., Greenwood, R., Sikaroodi, M., Lam, V., Crotty, P., Bailey, J., Myers, R.P., Rioux, K.P., 2013. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans With nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 868–875. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.02.015>
- Ramlan, N.F., Sata, N.S.A.M., Hassan, S.N., Bakar, N.A., Ahmad, S., Zulkifli, S.Z., Abdullah, C.A.C., Ibrahim, W.N.W., 2017. Time dependent effect of chronic embryonic exposure to ethanol on zebrafish: Morphology, biochemical and anxiety alterations. *Behav. Brain Res.* 332, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.048>

- Rangasamy, B., Hemalatha, D., Shobana, C., Nataraj, B., Ramesh, M., 2018. Developmental toxicity and biological responses of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to anti-inflammatory drug ketoprofen. *Chemosphere* 213, 423–433. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.013>
- Rao, A., LaBonne, C., 2018. Histone deacetylase activity has an essential role in establishing and maintaining the vertebrate neural crest. *Development* 145. <https://doi.org/10.1242/dev.163386>
- Raushan, H., Dixit, R., Das, M., Seth, P.K., 1987. Neurotoxicity of acrylamide in developing rat brain: Changes in the levels of brain biogenic amines and activities of monoamine oxidase and acetylcholine esterase. *Ind. Health* 25, 19–28. <https://doi.org/10.2486/indhealth.25.19>
- Rawson, D.M., Zhang, T., Kalicharan, D., Jongebloed, W.L., 2000. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: A consideration of the structural and fun. *Aquac. Res.* 31, 325–336. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00401.x>
- Reimers, M.J., Flockton, A.R., Tanguay, R.L., 2004. Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.012>
- Reis, J., Mizusawa, H., 2019. Environmental challenges for the nervous system and the brain in Japan. *Rev. Neurol. (Paris)*. 175, 693–697. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.09.002>
- Roche, H., Bogé, G., Pérès, G., 1994. Acute and chronic toxicities of colchicine in *Brachydanio rerio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 69–73. <https://doi.org/10.1007/BF00197359>
- Roche, H., Bogé, G., Pérès, G., 1993. Toxicity of colchicine towards a marine fish, *Dicentrarchus labrax*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp.* 106, 371–375. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90148-E](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90148-E)
- Roelandt, P., Obeid, S., Paeshuyse, J., Vanhove, J., Van Lommel, A., Nahmias, Y., Nevens, F., Neyts, J., Verfaillie, C.M., 2012. Human pluripotent stem cell-derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 57, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.03.030>
- Roelandt, P., Vanhove, J., Verfaillie, C., 2013. Directed differentiation of pluripotent stem cells to functional hepatocytes, in: *Pluripotent Stemcells*. S. 141–147. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0_11)
- Rogawski, M.A., Löscher, W., Rho, J.M., 2016. Mechanisms of action of antiseizure drugs and the ketogenic diet. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a022780. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022780>
- Roncero, C., Goodridge, A.G., 1992. Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture. *J. Biol. Chem.* 267, 14918–27.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M., 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80, 1021–1054. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1021>
- Rossberg, M., Lendle, W., Pfliederer, G., Tögel, A., Dreher, E.-L., Langer, E., Rassaerts, H., Kleinschmidt, P., Strack, H., Cook, R., Beck, U., Lipper, K.-A., Torkelson, T.R.,

- Löser, E., Beutel, K.K., Mann, T., 2006. Chlorinated hydrocarbons, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. [https://doi.org/10.1002/14356007.a06\\_233.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.a06_233.pub2)
- Rowell, P.P., Clark, M.J., 1982. The effect of chronic oral nicotine administration on fetal weight and placental amino acid accumulation in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 66, 30–38. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(82\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(82)90058-8)
- Roy, T., Sabherwal, U., 1994. Effects of prenatal nicotine exposure on the morphogenesis of somatosensory cortex. *Neurotoxicol. Teratol.* 16, 411–421. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0892-0362(94)90030-2)
- Rozkot, M., Václavková, E., Bělková, J., 2015. Minipigs as laboratory animals - review, Research in pig breeding.
- Rubinstein, A.L., 2006. Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2, 231–240. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.2.231>
- Ruhé, H.G., Mason, N.S., Schene, A.H., 2007. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol. Psychiatry* 12, 331–359. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001949>
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The principles of humane experimental techniques. Methuen, London.
- Saint-Amant, L., Drapeau, P., 1998. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J. Neurobiol.* 37, 622–632. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199812\)37:4<622::AID-NEU10>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199812)37:4<622::AID-NEU10>3.0.CO;2-S)
- Sancho, E., Villarroel, M.J., Fernández, C., Andreu, E., Ferrando, M.D., 2010. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.020>
- Sano, K., Isobe, T., Yang, J., Win-Shwe, T.-T., Yoshikane, M., Nakayama, S.F., Kawashima, T., Suzuki, G., Hashimoto, S., Nohara, K., Tohyama, C., Maekawa, F., 2016. *In utero* and lactational exposure to acetamiprid induces abnormalities in socio-sexual and anxiety-related behaviors of male mice. *Front. Neurosci.* 10, 228–240. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00228>
- Sasseville, D., Lafaille, P., Joncas, V., 2009. Allergic contact dermatitis from occupational exposure to dibutyl maleate. *Contact Dermatitis* 60, 298–300. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2009.01539.x>
- Scalzo, F.M., Levin, E.D., 2004. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as a model system in neurobehavioral toxicology. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 707–708. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.008>
- Schill, E.M., Lake, J.I., Tusheva, O.A., Nagy, N., Bery, S.K., Foster, L., Avetisyan, M., Johnson, S.L., Stenson, W.F., Goldstein, A.M., Heuckeroth, R.O., 2016. Ibuprofen slows migration and inhibits bowel colonization by enteric nervous system precursors in zebrafish, chick and mouse. *Dev. Biol.* 409, 473–488. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.09.023>
- Schmitt, E.A., Dowling, J.E., 1999. Early retinal development in the Zebrafish, *Danio rerio*: Light and electron microscopic analyses. *J. Comp. Neurol.* 404, 515–536. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990222\)404:4<515::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990222)404:4<515::AID-)

CNE8>3.0.CO;2-A

- Schock, E.N., Ford, W.C., Midgley, K.J., Fader, J.G., Giavasis, M.N., McWhorter, M.L., 2012. The effects of carbaryl on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Zebrafish* 9, 169–178. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0747>
- Scholz, D., Pörtl, D., Genewsky, A., Weng, M., Waldmann, T., Schildknecht, S., Leist, M., 2011. Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. *J. Neurochem.* 119, 957–971. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07255.x>
- Scholz, G., Genschow, E., Pohl, I., Bremer, S., Paparella, M., Raabe, H., Southee, J., Spielmann, H., 1999. Prevalidation of the embryonic stem cell test (EST)—A new *in vitro* embryotoxicity test. *Toxicol. Vitro.* 13, 675–681. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(99\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(99)00046-6)
- Scholz, S., Ortmann, J., Klüver, N., Léonard, M., 2014. Extensive review of fish embryo acute toxicities for the prediction of GHS acute systemic toxicity categories. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.06.004>
- Schumann, J., 2010. Teratogen screening: state of the art. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2, 115–121.
- Selderslaghs, I.W.T., Hooyberghs, J., Blust, R., Witters, H.E., 2013. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicol. Teratol.* 37, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.003>
- Selderslaghs, I.W.T., Hooyberghs, J., De Coen, W., Witters, H.E., 2010. Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 460–471. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.03.002>
- Selderslaghs, I.W.T., Van Rompay, A.R., De Coen, W., Witters, H.E., 2009. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reprod. Toxicol.* 28, 308–320. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.05.004>
- Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., Noble-Haeusslein, L.J., 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- Seok, S.H., Park, Jong Hwan, Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Uhm, H.M., Hong, J.J., Na, Y.R., Jin, B.H., Ryu, D.Y., Park, Jae Hak, 2006. Specific activation of the human HSP70 promoter by copper sulfate in mosaic transgenic zebrafish. *J. Biotechnol.* 126, 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.04.029>
- Seretny, M., Currie, G.L., Sena, E.S., Ramnarine, S., Grant, R., MacLeod, M.R., Colvin, L.A., Fallon, M., 2014. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* 155, 2461–2470. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.020>
- Shaw, B.J., Liddle, C.C., Windeatt, K.M., Handy, R.D., 2016. A critical evaluation of the fish early-life stage toxicity test for engineered nanomaterials: experimental modifications and recommendations. *Arch. Toxicol.* 90, 2077–2107. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1734-7>
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., Graham, F.L., 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells.

- FASEB J. 16, 869–871. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0995fje>
- Sheets, L., 2001. Study No. 110245: A developmental neurotoxicity study with technical grade imidacloprid in Wistar rats. Kansas, USA.
- Sheets, L., 1994. Study No. 10634-1: An acute oral neurotoxicity screening with technical grade imidacloprid (NTN 33893) in rats.
- Shepherd, I.T., 2004. Roles for GFR 1 receptors in zebrafish enteric nervous system development. *Development* 131, 241–249. <https://doi.org/10.1242/dev.00912>
- Shi, Y., Kirwan, P., Livesey, F.J., 2012. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat. Protoc.* 7, 1836–1846. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.116>
- Shi, Y., Li, J., Chen, C., Xia, Y., Li, Y., Zhang, P., Xu, Y., Li, T., Zhou, W., Song, W., 2018. Ketamine Modulates Zic5 Expression via the Notch Signaling Pathway in Neural Crest Induction. *Front. Mol. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00009>
- Shubin, N., Tabin, C., Carroll, S., 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 457, 818–823. <https://doi.org/10.1038/nature07891>
- Silcox, D.H., Daftari, T., Boden, S.D., Schimandle, J.H., Hutton, W.C., Whitesides, T.E., 1995. The effect of nicotine on spinal fusion. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 20, 1549–1553. <https://doi.org/10.1097/00007632-199507150-00001>
- Silva, M.H., Gammon, D., 2009. An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 86, 1–28. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20183>
- Singh, C., Oikonomou, G., Prober, D.A., 2015. Norepinephrine is required to promote wakefulness and for hypocretin-induced arousal in zebrafish. *Elife* 4, e07000. <https://doi.org/10.7554/eLife.07000>
- Şişman, T., Geyikoğlu, F., 2008. The teratogenic effects of polychlorinated naphthalenes (PCNs) on early development of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.09.001>
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z., Slaninová, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z., 2009. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuro Endocrinol. Lett.* 30 Suppl 1, 2–12. <https://doi.org/NEL300709R01> [pii]
- Smith, A.C., Swindle, M.M., 2006. Preparation of swine for the laboratory. *ILAR J.* 47, 358–363. <https://doi.org/10.1093/ilar.47.4.358>
- Smith, D., 1999. Worldwide trends in DDT levels in human breast milk. *Int. J. Epidemiol.* 28, 179–188. <https://doi.org/10.1093/ije/28.2.179>
- Soares, M.J., Chakraborty, D., Karim Rumi, M.A., Konno, T., Renaud, S.J., 2012. Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta* 33, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.026>
- Sobanska, M., Scholz, S., Nyman, A.-M.M., Cesnaitis, R., Gutierrez Alonso, S., Klüver, N., Kühne, R., Tyle, H., de Knecht, J., Dang, Z., Lundbergh, I., Carlon, C., De Coen, W., 2018. Applicability of the fish embryo acute toxicity (FET) test (OECD 236) in the regulatory context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 657–670. <https://doi.org/10.1002/etc.4055>

- Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., 1975. Nervous system degeneration produced by acrylamide monomer. *Environ. Health Perspect.* 11, 129–133. <https://doi.org/10.1289/ehp.7511129>
- Stapleton, H.M., Letcher, R.J., Li, J., Baker, J.E., 2004. Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (<i>Cyprinus carpio</i>). *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1939–1946. <https://doi.org/10.1897/03-462>
- Stickney, H.L., Barresi, J.F., Devoto, S.H., 2000. Somite development in zebrafish. *Dev. Dyn.* 219, 287–303. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A)
- Stiegler, N. V., Krug, A.K., Matt, F., Leist, M., 2011. Assessment of chemical-induced impairment of human neurite outgrowth by multiparametric live cell imaging in high-density cultures. *Toxicol. Sci.* 121, 73–87. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr034>
- Stoker, T.E., Gibson, E.K., Zorrilla, L.M., 2010. Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female wistar rat. *Toxicol. Sci.* 117, 45–53. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq180>
- Strecker, R., Weigt, S., Braunbeck, T., 2013. Cartilage and bone malformations in the head of zebrafish (*Danio rerio*) embryos following exposure to disulfiram and acetic acid hydrazide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.023>
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F., 1981. Production of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293–296. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90155-R](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90155-R)
- Strungaru, S.-A., Robea, M.A., Plavan, G., Todirascu-Ciornea, E., Ciobica, A., Nicoara, M., 2018. Acute exposure to methylmercury chloride induces fast changes in swimming performance, cognitive processes and oxidative stress of zebrafish (*Danio rerio*) as reference model for fish community. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 47, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.01.019>
- Sullivan, F.M., 1999. Significance of excursions of intake above the acceptable daily intake: Effect of time and dose in developmental toxicology. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30, 94–98. <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1332>
- Sun, G., Liu, K., 2017. Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzyl phthalate in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 192, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.020>
- Svoboda, K.R., Vijayaraghavan, S., Tanguay, R.L., 2002. Nicotinic receptors mediate changes in spinal motoneuron development and axonal pathfinding in embryonic zebrafish exposed to nicotine. *J. Neurosci.* 22, 10731–41.
- Takada, T., Yoneda, N., Hirano, T., Yanai, S., Yamamoto, A., MANTANI, Y., Yokoyama, T., Kitagawa, H., Tabuchi, Y., Hoshi, N., 2018. Verification of the causal relationship between subchronic exposures to dinotefuran and depression-related phenotype in juvenile mice. *J. Vet. Med. Sci.* 80, 720–724. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0022>
- Tanaka, T., 2012. Reproductive and neurobehavioral effects of clothianidin administered to mice in the diet. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 95, 151–159. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20349>
- Tang, W., Borel, A.G., Fujimiya, T., Abbott, F.S., 1995. Fluorinated analogues as mechanistic probes in valproic acid hepatotoxicity: Hepatic microvesicular steatosis

- and glutathione status. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 671–682.  
<https://doi.org/10.1021/tx00047a006>
- Teixidó, E., Kießling, T.R., Krupp, E., Quevedo, C., Muriana, A., Scholz, S., 2019. Automated morphological feature assessment for zebrafish embryo developmental toxicity screens. *Toxicol. Sci.* 167, 438–449. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy250>
- Terayama, H., Endo, H., Tsukamoto, H., Matsumoto, K., Umezu, M., Kanazawa, T., Ito, M., Sato, T., Naito, M., Kawakami, S., Fujino, Y., Tatemichi, M., Sakabe, K., 2016. Acetamidiprid accumulates in different amounts in murine brain regions. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13. <https://doi.org/10.3390/ijerph13100937>
- Thakur, M., Pathania, D., 2020. Environmental fate of organic pollutants and effect on human health, in: *Abatement of Environmental Pollutants*. Elsevier, S. 245–262. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818095-2.00012-6>
- Theunissen, P.T., Beken, S., Beyer, B., Breslin, W.J., Cappon, G.D., Chen, C.L., Chmielewski, G., de Schaepdrijver, L., Enright, B., Foreman, J.E., Harrouk, W., Hew, K.-W., Hoberman, A.M., Y. Hui, J., Knudsen, T.B., Laffan, S.B., Makris, S.L., Martin, M., McNERney, M.E., Siezen, C.L., Stanislaus, D.J., Stewart, J., Thompson, K.E., Tornesi, B., Van der Laan, J.W., Weinbauer, G.F., Wood, S., Piersma, A.H., 2017. Comparing rat and rabbit embryo-fetal developmental toxicity data for 379 pharmaceuticals: on systemic dose and developmental effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 47, 409–421. <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1224808>
- Theunissen, P.T., Beken, S., Beyer, B.K., Breslin, W.J., Cappon, G.D., Chen, C.L., Chmielewski, G., De Schaepdrijver, L., Enright, B., Foreman, J.E., Harrouk, W., Hew, K.-W., Hoberman, A.M., Hui, J.Y., Knudsen, T.B., Laffan, S.B., Makris, S.L., Martin, M., McNERney, M.E., Siezen, C.L., Stanislaus, D.J., Stewart, J., Thompson, K.E., Tornesi, B., Van der Laan, J.W., Weinbauer, G.F., Wood, S., Piersma, A.H., 2016. Comparison of rat and rabbit embryo–fetal developmental toxicity data for 379 pharmaceuticals: on the nature and severity of developmental effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 46, 900–910. <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1224807>
- Thomas, B., Bhat, K., Mapara, M., 2012. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent. Res. J. (Isfahan)*. 9, 111–118. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.92960>
- Thomas, E.D., Cruz, I.A., Hailey, D.W., Raible, D.W., 2015. There and back again: Development and regeneration of the zebrafish lateral line system. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4, 1–16. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Thomas, L.T., Welsh, L., Galvez, F., Svoboda, K.R., 2009. Acute nicotine exposure and modulation of a spinal motor circuit in embryonic zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.08.023>
- Tian, X., Hong, X., Yan, S., Li, X., Wu, H., Lin, A., Yang, W., 2020. Neonicotinoids caused oxidative stress and DNA damage in juvenile Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 197, 110566. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110566>
- Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011>
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>

- Ton, C., Lin, Y., Willett, C., 2006. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 76, 553–567. <https://doi.org/10.1002/bdra.20281>
- Tripier, M.F., Bérard, M., Toga, M., Martin-Bouyer, G., Le Breton, R., Garat, J., 1981. Hexachlorophene and the central nervous system - Toxic effects in mice and baboons. *Acta Neuropathol.* 53, 65–74. <https://doi.org/10.1007/BF00697186>
- Tropepe, V., Sive, H.L., 2003. Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism? *Genes, Brain Behav.* 2, 268–281. <https://doi.org/10.1034/j.1601-183X.2003.00038.x>
- Tseng, H., Hseu, T., Buhler, D., Wang, W., Hu, C., 2005. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.019>
- Turner, C., Sawle, A., Fenske, M., Cossins, A., 2012. Implications of the solvent vehicles dimethylformamide and dimethylsulfoxide for establishing transcriptomic endpoints in the zebrafish embryo toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 593–604. <https://doi.org/10.1002/etc.1718>
- Tyl, R.W., Friedman, M.A., 2003. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod. Toxicol.* 17, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00078-3)
- Udan, R.S., Dickinson, M.E., 2010. Imaging mouse embryonic development. *S.* 329–349. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)76019-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)76019-5)
- Ujházy, E., Mach, M., Navarová, J., Brucknerová, I., Dubovický, M., 2012. Teratology – Past, present and future. *Interdiscip. Toxicol.* 5, 163–168. <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0027-0>
- Uribe, R.A., Bronner, M.E., 2015. *Meis3* is required for neural crest invasion of the gut during zebrafish enteric nervous system development. *Mol. Biol. Cell* 26, 3728–3740. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0112>
- van den Brandhof, E.-J., Montforts, M., 2010. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1862–1866. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.031>
- Van den Bulck, K., Hill, A., Mesens, N., Diekman, H., De Schaepdrijver, L., Lammens, L., 2011. Zebrafish developmental toxicity assay: A fishy solution to reproductive toxicity screening, or just a red herring? *Reprod. Toxicol.* 32, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.119>
- van der Burg, B., Pieterse, B., Buist, H., Lewin, G., van der Linden, S.C., Man, H. yen, Rorije, E., Piersma, A.H., Mangelsdorf, I., Wolterbeek, A.P.M., Kroese, E.D., van Vugt-Lussenburg, B., 2015. A high throughput screening system for predicting chemically-induced reproductive organ deformities. *Reprod. Toxicol.* 55, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.11.011>
- Vandamme, T.F., 2014. Use of rodents as models of human diseases. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 6, 2–10. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.124301>
- Vanhove, J., Pistoni, M., Welters, M., Eggermont, K., Vanslembrouck, V., Helsen, N., Boon, R., Najimi, M., Sokal, E., Collas, P., Voncken, J.W., Verfaillie, C.M., 2016. *H3K27me3* does not orchestrate the expression of lineage-specific markers in hESC-derived hepatocytes *in vitro*. *Stem Cell Reports* 7, 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.06.013>

- Vassiliadis, J., Graudins, A., Dowsett, R.P., 1999. Triethylene glycol poisoning treated with intravenous ethanol infusion. *J. Toxicol. - Clin. Toxicol.* 37, 773–776. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102455>
- Venzin, O.F., Oates, A.C., 2020. What are you synching about? Emerging complexity of *Notch* signaling in the segmentation clock. *Dev. Biol.* 460, 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.024>
- Vignet, C., Cappello, T., Fu, Q., Lajoie, K., De Marco, G., Clérandeau, C., Mottaz, H., Maisano, M., Hollender, J., Schirmer, K., Cachot, J., 2019. Imidacloprid induces adverse effects on fish early life stages that are more severe in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) than in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 225, 470–478. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.002>
- Viluksela, M., Heikkinen, P., van der Ven, L.T.M., Rendel, F., Roos, R., Esteban, J., Korkalainen, M., Lensu, S., Miettinen, H.M., Savolainen, K., Sankari, S., Lilienthal, H., Adamsson, A., Toppari, J., Herlin, M., Finnilä, M., Tuukkanen, J., Leslie, H.A., Hamers, T., Hamscher, G., Al-Anati, L., Stenius, U., Dervola, K.-S., Bogen, I.-L., Fonnum, F., Andersson, P.L., Schrenk, D., Halldin, K., Håkansson, H., 2014. Toxicological profile of ultrapure 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 180) in adult rats. *PLoS One* 9, e104639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104639>
- Vinggaard, A.M., Hass, U., Dalgaard, M., Andersen, H.R., Bonefeld-Jørgensen, E., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M.E., 2006. Prochloraz: An imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *Int. J. Androl.* 29, 186–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00604.x>
- Vliegenthart, A.D.B., Tucker, C.S., Del Pozo, J., Dear, J.W., 2014. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 78, 1217–1227. <https://doi.org/10.1111/bcp.12408>
- Vliet, S.M., Ho, T.C., Volz, D.C., 2017. Behavioral screening of the LOPAC1280 library in zebrafish embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 329, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.06.011>
- von Hellfeld, R., Brotzmann, K., Baumann, L., Strecker, R., Braunbeck, T., 2020. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Sci. Eur.* 32, 122. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00398-3>
- Vorhees, C. V., Williams, M.T., Hawkey, A.B., Levin, E.D., 2021. Translating neurobehavioral toxicity across species from zebrafish to rats to humans: Implications for risk assessment. *Front. Toxicol.* 3, 629229. <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.629229>
- Wake, D.B., Wake, M.H., Specht, C.D., 2011. Homoplasy: From detecting pattern to determining process and mechanism of evolution. *Science (80-. )*. 331, 1032–1035. <https://doi.org/10.1126/science.1188545>
- Wang-Buhler, J.L., Lee, S.J., Chung, W.G., Stevens, J.F., Tseng, H.P., Hseu, T.H., Hu, C.H., Westerfield, M., Yang, Y.H., Miranda, C.L., Buhler, D.R., 2005. CYP2K6 from zebrafish (*Danio rerio*): Cloning, mapping, developmental/tissue expression, and aflatoxin B1 activation by baculovirus expressed enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 140, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.02.002>
- Wang, Y., Li, X., Yang, G., Weng, H., Wang, X., Wang, Q., 2020. Changes of enzyme

- activity and gene expression in embryonic zebrafish co-exposed to beta-cypermethrin and thiacloprid. *Environ. Pollut.* 256, 113437. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113437>
- Wang, Yali, Liu, W., Yang, J., Wang, F., Sima, Y., Zhong, Z. min, Wang, H., Hu, L.F., Liu, C.F., 2017. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. *Neurotoxicology* 58, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.11.006>
- Wang, Yanhua, Yang, G., Dai, D., Xu, Z., Cai, L., Wang, Q., Yu, Y., 2017. Individual and mixture effects of five agricultural pesticides on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 4528–4536. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8205-9>
- Warkentin, K.M., Caldwell, M.S., McDaniel, J.G., 2006. Temporal pattern cues in vibrational risk assessment by embryos of the red-eyed treefrog, *Agalychnis callidryas*. *J. Exp. Biol.* 209, 1376–1384. <https://doi.org/10.1242/jeb.02150>
- Webster, W.S., 1988. The use of animal models in understanding human teratogens. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 28, 295–302. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.1988.tb00968.x>
- Webster, W.S., Brown-Woodman, P.D., Ritchie, H.E., 1997. A review of the contribution of whole embryo culture to the determination of hazard and risk in teratogenicity testing. *Int. J. Dev. Biol.* 41, 329–35.
- Weichert, F.G., Floeter, C., Meza Artmann, A.S., Kammann, U., 2017. Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances – Evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of *Danio rerio*. *Chemosphere* 186, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.136>
- Welsh, L., Tanguay, R.L., Svoboda, K.R., 2009. Uncoupling nicotine mediated motoneuron axonal pathfinding errors and muscle degeneration in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 237, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.06.025>
- Westerfield, M., 2000. *The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 4. ed. University of Oregon Press, Eugene.
- Weston, A., Caminada, D., Galicia, H., Fent, K., 2009. Effects of lipid-lowering pharmaceuticals bezafibrate and clofibrac acid on lipid metabolism in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2648–2655. <https://doi.org/10.1897/09-087.1>
- Wieser, M., Stadler, G., Jennings, P., Streubel, B., Pfaller, W., Ambros, P., Riedl, C., Katinger, H., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R., 2008. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am. J. Physiol. Physiol.* 295, F1365–F1375. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90405.2008>
- Williams, J., Gladen, B., Schrader, S.M., Turner, T.W., Phelbs, J.L., Chapin, R., 1990. Semen analysis and fertility assessment in rabbits: Statistical power and design considerations for toxicology studies. *Fundam. Appl. Toxicol.* 15, 651–665. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(90\)90182-J](https://doi.org/10.1016/0272-0590(90)90182-J)
- Wilt, F.H., Hake, S., 2003. *Principles of developmental biology*. W.W. Norton & Company.
- Winneke, G., Bucholski, A., Heinzow, B., Krämer, U., Schmidt, E., Walkowiak, J., Wiener, J.A., Steingrüber, H.J., 1998. Developmental neurotoxicity of

- polychlorinated biphenyls (PCBS): Cognitive and psychomotor functions in 7-month old children. *Toxicol. Lett.* 102–103, 423–428. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00334-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00334-8)
- Wolf, J.C., Wheeler, J.R., 2018. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquat. Toxicol.* 197, 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>
- World Health Organisation, 2006. World alliance for patient safety WHO guidelines on hand hygiene in health care global patient safety challenge 2005-2006: Clean care is safer care, World Health Publications.
- World Health Organisation, 2000. Dinitro-ortho-cresol, Environmental Health Criteria 220.
- Wronikowska, O., Michalak, A., Skalicka-Woźniak, K., Crawford, A.D., Budzyńska, B., 2020. Fishing for a deeper understanding of nicotine effects using zebrafish behavioural models. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 98, 109826. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109826>
- Wu, S., Li, X., Liu, X., Yang, G., An, X., Wang, Q., Wang, Y., 2018. Joint toxic effects of triazophos and imidacloprid on zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Pollut.* 235, 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.120>
- Wullimann, M.F., 2009. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review. *Integr. Zool.* 4, 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2008.00140.x>
- Xia, L., Zheng, L., Zhou, J.L., 2017. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 182, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.054>
- Xu, Z., Williams, F.E., Liu, M.-C., 2011. Developmental toxicity of dextrmethorphan in zebrafish embryos/larvae. *J. Appl. Toxicol.* 31, 157–163. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Yamagami, K., 1981. Mechanisms of hatching in fish: Secretion of hatching enzyme and enzymatic choriolysis. *Integr. Comp. Biol.* 21, 459–471. <https://doi.org/10.1093/icb/21.2.459>
- Yamashita, A., Inada, H., Chihara, K., Yamada, T., Deguchi, J., Funabashi, H., 2014. Improvement of the evaluation method for teratogenicity using zebrafish embryos. *J. Toxicol. Sci.* 39, 453–464. <https://doi.org/10.2131/jts.39.453>
- Yan, Z., Huang, X., Xie, Y., Song, M., Zhu, K., Ding, S., 2019. Macrolides induce severe cardiotoxicity and developmental toxicity in zebrafish embryos. *Sci. Total Environ.* 649, 1414–1421. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.432>
- Yang, D., Lauridsen, H., Buels, K., Chi, L.-H., La Du, J., Bruun, D.A., Olson, J.R., Tanguay, R.L., Lein, P.J., 2011. Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior. *Toxicol. Sci.* 121, 146–159. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr028>
- Yang, J. Di, Liu, S.H., Liao, M.H., Chen, R.M., Liu, P.Y., Ueng, T.H., 2018. Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. *Environ. Toxicol.* 33, 899–907. <https://doi.org/10.1002/tox.22575>
- Yang, L., Ho, N.Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Müller, F., Strähle, U., 2009. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and

- teratological effects of chemicals. *Reprod. Toxicol.* 28, 245–253.  
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.04.013>
- Yang, X., Sun, Z., Wang, W., Zhou, Q., Shi, G., Wei, F., Jiang, G., 2018. Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. *Sci. Total Environ.* 643, 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.213>
- Yao, Q., Desmidt, A.A., Tekin, M., Liu, X., Lu, Z., 2016. Hearing assessment in zebrafish during the first week postfertilization. *Zebrafish* 13, 79–86.  
<https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1166>
- Yokel, R.A., Allen, D.D., Meyer, J.J., 1994. Studies of aluminum neurobehavioral toxicity in the intact mammal. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14, 791–808.  
<https://doi.org/10.1007/BF02088685>
- Yoneda, N., Takada, T., Hirano, T., Yanai, S., Yamamoto, A., Mantani, Y., Yokoyama, T., Kitagawa, H., Tabuchi, Y., Hoshi, N., 2018. Peripubertal exposure to the neonicotinoid pesticide dinotefuran affects dopaminergic neurons and causes hyperactivity in male mice. *J. Vet. Med. Sci.* 80, 634–637.  
<https://doi.org/10.1292/jvms.18-0014>
- Yoo, M.H., Rah, Y.C., Park, S., Koun, S., Im, G.J., Chae, S.W., Jung, H.H., Choi, J., 2018. Impact of nicotine exposure on hair cell toxicity and embryotoxicity during zebrafish development. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 11, 109–117.  
<https://doi.org/10.21053/ceo.2017.00857>
- Yorifuji, T., 2020. Lessons from an early-stage epidemiological study of minamata disease. *J. Epidemiol.* 30, 12–14. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20190089>
- Yu, P.B., Hong, C.C., Sachidanandan, C., Babitt, J.L., Donna, Y., Hoyng, S. a, Lin, H.Y., Bloch, K.D., Peterson, R.T., 2009. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and Iron Metabolism. *Nat. Chem. Biol.* 4, 33–41.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.54.Dorsomorphin>
- Yueh, M.-F., Tukey, R.H., 2016. Triclosan: A widespread environmental toxicant with many biological effects. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 251–272.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103417>
- Zawada, W.M., Banninger, G.P., Thornton, J., Marriott, B., Cantu, D., Rachubinski, A.L., Das, M., Griffin, W.S.T., Jones, S.M., 2011. Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade. *J. Neuroinflammation* 8, 129.  
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-129>
- Zeddies, D.G., Fay, R.R., 2005. Development of the acoustically evoked behavioral response in zebrafish to pure tones. *J. Exp. Biol.* 208, 1363–1372.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.01534>
- Zellner, D., Padnos, B., Hunter, D.L.L., MacPhail, R.C.C., Padilla, S., 2011. Rearing conditions differentially affect the locomotor behavior of larval zebrafish, but not their response to valproate-induced developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 674–679. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.06.007>
- Zeza, D., Tait, S., Della Salda, L., Amorena, M., Merola, C., Perugini, M., 2019. Toxicological, gene expression and histopathological evaluations of environmentally realistic concentrations of polybrominated diphenyl ethers PBDE- 47, PBDE-99 and PBDE-209 on zebrafish embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 183, 109566.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109566>

- Zhang, C., Cao, J., Kenyon, J.R., Panzica-Kelly, J.M., Gong, L., Augustine-Rauch, K., 2012. Development of a streamlined rat whole embryo culture assay for classifying teratogenic potential of pharmaceutical compounds. *Toxicol. Sci.* 127, 535–546. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs112>
- Zhang, C., Cheng, F., Sun, L., Zhuang, S., Li, W., Liu, G., Lee, P.W., Tang, Y., 2015. *In silico* prediction of chemical toxicity on avian species using chemical category approaches. *Chemosphere* 122, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.001>
- Zhang, H., Zhao, L., 2017. Influence of sublethal doses of acetamiprid and halosulfuron-methyl on metabolites of zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 191, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.002>
- Zhang, K., Yuan, G., Werdich, A.A., Zhao, Y., 2020. Ibuprofen and diclofenac impair the cardiovascular development of zebrafish (*Danio rerio*) at low concentrations. *Environ. Pollut.* 258, 113613. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113613>
- Zheng, Y., Zhu, X., Zhou, P., Lan, X., Xu, H., Li, M., Gao, Z., 2012. Hexachlorophene is a potent KCNQ1/KCNE1 potassium channel activator which rescues LQTs mutants. *PLoS One* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051820>
- Zhou, S.-F., Zhou, Z.-W., Yang, L.-P., Cai, J.-P., 2009. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Curr. Med. Chem.* 16, 3480–675. [https://doi.org/CMC - AbsEpub - 001 \[pii\]](https://doi.org/CMC - AbsEpub - 001 [pii])
- Zhou, S., Ochalek, A., Szczesna, K., Avci, H.X., Kobolák, J., Varga, E., Rasmussen, M., Holst, B., Cirera, S., Hyttel, P., Freude, K.K., Dinnyés, A., 2016. The positional identity of iPSC-derived neural progenitor cells along the anterior-posterior axis is controlled in a dosage-dependent manner by bFGF and EGF. *Differentiation* 92, 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.06.002>
- Zimmer, B., Lee, G., Balmer, N. V, Meganathan, K., Sachinidis, A., Studer, L., Leist, M., 2012. Evaluation of developmental toxicants and signaling pathways in a functional test based on the migration of human neural crest cells. *Environ. Health Perspect.* 120, 1116–1122. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104489>
- Zindler, F., Beedgen, F., Brandt, D., Steiner, M., Stengel, D., Baumann, L., Braunbeck, T., 2019a. Analysis of tail coiling activity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 186, 109754. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109754>
- Zindler, F., Beedgen, F., Braunbeck, T., 2019b. Time-course of coiling activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to ethanol as an endpoint for developmental neurotoxicity (DNT) – Hidden potential and underestimated challenges. *Chemosphere* 235, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.154>
- Zindler, F., Stoll, S., Baumann, L., Knoll, S., Huhn, C., Braunbeck, T., 2020a. Do environmentally relevant concentrations of fluoxetine and citalopram impair stress-related behavior in zebrafish (*Danio rerio*) embryos? *Chemosphere* 261, 127753. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127753>
- Zindler, F., Tisler, S., Loerracher, A.-K., Zwiener, C., Braunbeck, T., 2020b. Norfluoxetine Is the only metabolite of fluoxetine in zebrafish (*Danio rerio*) embryos that accumulates at environmentally relevant exposure scenarios. *Environ. Sci. Technol.* 54, 4200–4209. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07618>

- Zou, Y., Zhang, Y., Han, L., He, Q., Hou, H., Han, J., Wang, X., Li, C., Cen, J., Liu, K., 2017. Oxidative stress-mediated developmental toxicity induced by isoniazide in zebrafish embryos and larvae. *J. Appl. Toxicol.* 37, 842–852. <https://doi.org/10.1002/jat.3432>
- Zychowicz, M., Dziejzicka, D., Mehn, D., Kozłowska, H., Kinsner-Ovaskainen, A., Stepień, P.P., Rossi, F., Buzanska, L., 2014. Developmental stage dependent neural stem cells sensitivity to methylmercury chloride on different biofunctional surfaces. *Toxicol. Vitr.* 28, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.023>

## Annex

### ANNEX I

Annex I, Tabelle 1. Überblick über die Anwendung(en) von DART- und DNT-Substanzen, betroffene(s) Organ(e) und biologische Wirkungen, wie in der Literatur beschrieben

Compound name	Chemical class	Application(s)	Affected organ(s)	Molecular/Biochemical effect(s)
Acetamiprid	Chloropyridyl	Pesticide	Nervous system	nAChE receptor binding (Tomizawa und Casida, 2005)
Acrylamide	Amide	Plastic thickener	Liver, nervous system	Endocrine disruption (Tyl und Friedman, 2003) Potassium channel inhibition (Faria u. a., 2018) AChE inhibition (Schock u. a., 2012)
Carbaryl	Carbamate	Insecticide	Nervous system	CPY450 induction (Slaninova u. a., 2009) Competitive binding to melatonin receptors (Popovska-Gorevski u. a., 2017)
Clofibrate	Fibrate	Anti-hyper-lipidemic	Liver	PPAR $\alpha$ agonist (Kamstra u. a., 2015) CYP450 induction (Laville u. a., 2004)
Clothianidin	Chlorothiazole	Pesticide	Nervous system	nAChE receptor binding (Tomizawa und Casida, 2005)
Colchicine	Alkaloid	Anti-inflammatory, antineoplastic	Neuronal system	Microtubule inhibition via tubulin binding (Avila u. a., 1987) Neutrophil adhesion inhibition (Dalbeth u. a., 2014)
Dinotefuran	Furanyl	Pesticide	Nervous system	nAChE receptor binding (Tomizawa und Casida, 2005)
Hexachlorphene	Organo-chlorine	Fungicide, acaricide, antibiotic, flukicide	Liver, kidney, nervous system	Membrane-bound electron transport chain inhibition (Zheng u. a., 2012) Lesions in white matter of neural cord (Tripier u. a., 1981) Vacuolar degeneration (World Health Organisation, 2006)

Compound name	Chemical class	Application(s)	Affected organ(s)	Molecular/Biochemical effect(s)
Ibuprofen	Propionic acid	Non-steroidal anti-inflammatory	Kidney, nervous system, intestines	Direct COX inhibition (David und Pancharatna, 2009a) PPAR $\alpha$ and $\gamma$ activation (Puhl u. a., 2015)
Imidacloprid	Imidazolidine	Pesticide	Nervous system	nAChE receptor binding (Tomizawa und Casida, 2005)
1-Methyl-4-phenyl-pyridinium iodide	Tetrahydropyridine metabolite	Herbicide	Nervous system	Oxidative stress promotion (Zawada u. a., 2011) Mitochondrial complex I inhibition (Chong u. a., 2015)
Nicotine	Dinitrogen alkaloid	Stimulant	Nervous system	nAChE receptor binding (Tomizawa und Casida, 2005)
Paracetamol	Para-amino-phenol	Antipyretic	Liver, kidney, nervous system	Oxidative stress promotion (K. Du u. a., 2016) Indirect COX-2 inhibition (David und Pancharatna, 2009b)
Paraquat	Bipyridylum	Herbicide	Lung, liver, kidney, neuronal system	Oxidative stress promotion (Lushchak, 2016) Neuronal damage (Bretaud u. a., 2004)
Polychlorinated biphenyl 180 (PCB 180)	Non-volatile chlorinated hydrocarbon	Coolant, plasticiser (banned)	Liver	Glutamate-NO-cGMP pathway inhibition (Llansola u. a., 2009)
Rifampicin	Rifamycin	Antibiotic	Liver, kidney	RNA polymerase inhibition (Campbell u. a., 2001) CYP450 induction (Mahatthanatrakul u. a., 2007)
Rotenone	Rotenoids	Insecticide, acaricide, piscicide	Liver, kidney, nervous system	Oxidative stress promotion (Yali Wang u. a., 2017) Microtubule formation disruption (Cheng und Farrell, 2007)
Sulfisoxazole	Sulfonamide	Antibiotic	Bacterial	Folic acid synthesis and CYP450 inhibition (Hong u. a., 1995)
Taxol	Taxane	Chemotherapy drug	Neuronal system	Tubulin $\beta$ -1 chain inhibition (Brito u. a., 2008) Oxidative stress promotion (Lisse u. a., 2016)

Compound name	Chemical class	Application(s)	Affected organ(s)	Molecular/Biochemical effect(s)
Tebuconazole	Azole	Fungicide	Liver	Cell wall production disruption & endocrine disruption (Sancho u. a., 2010) CYP450 inhibition & oxidative stress promotion (J. Di Yang u. a., 2018) AChE inhibition (Altenhofen u. a., 2017)
Thiacloprid	Chloropyridyl	Pesticide	Nervous system	nAChE receptor binding (Tomizawa und Casida, 2005)
Thiamethoxam	Chlorothiazole	Pesticide	Nervous system	nAChE receptor binding (Tomizawa und Casida, 2005)
Tolbutamide	Sulfonylurea	Hypoglycaemic drug	Liver, kidney	Potassium channel closure of $\beta$ -cells (Zhou u. a., 2009)
Triphenylphosphate	Phenol	Industrial compound	Liver, neuronal system	Endocrine disruption (Liu u. a., 2016) Metabolic disruption (PPAR $\gamma$ ) (Z. Du u. a., 2016) CYP inhibition (Isales u. a., 2015)

Annex I, Tabelle 2. Informationen über die Stabilität und Löslichkeit der DART- und DNT-Substanzen, die aus verschiedenen Quellen stammen (von Hellfeld u. a., 2020)

Compound	CAS no.	MW (g/Mol)	Solubility in water #	Log K <sub>ow</sub> #	Stability and biodegradability	Particle adsorption in water #
Acetamiprid	160430-64-8	222.68	3 g/l (20 °C, pH 5)	0.8	Photolysis half-life: 34 d at 25 °C, pH 7 #	Not expected
Acrylamide	79-06-1	71.08	390 mg/mL (25 °C)	-0.67	Biodegradation in water likely. River die-away test: 90% reduction within 150 h #	n/a
Carbaryl	63-25-2	201.22	110 mg/l (22 °C)	2.36	Biodegradation: 96 h (ocean). Half-life: 1.7 d. Hydrolysed by various microorganisms, half-life at 20 °C and pH 7, 1.8 d #	Expected
Clofibrate	637-07-0	242.70	Insoluble	n/a	Not readily biodegradable *	n/a
Clothianidin	210880-92-5	249.68	300 mg/l	0.7	Lacks functional groups for hydrolysis. Photolysis half-life: <1 d #	Not expected
Colchicine	64-86-8	399.44	45 g/l (25 °C)	1.03	Lacks functional groups for hydrolysis #. Readily biodegradable *	Expected
Dinotefuran	165252-70-0	202.21	39.8 g/l	n/a	n/a	n/a
Hexachlorophene	70-30-4	406.89	140 mg/l (25 °C)	7.54	Lacks functional groups for hydrolysis. Photolysis: possible, absorbs 302 nm (pH7) and 312 nm (pH8). Moderate to high bioaccumulation #	Expected
Ibuprofen	15687-27-1	206.285	21 mg/l (25 °C)	3.97	Carboxylic acids generally hydrolysis resistant. Biodegradation half-life: 20 d (lake). At pH 5-9, exists almost entirely in cation form – volatilisation possible #	Expected
Imidacloprid	138261-41-3	255.66	600 mg/l	0.57	At pH 5-9, exists almost entirely in cation form. Hydrolytically stable at pH 5-11 #	Expected
1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide	39794-99-5	297.14	10 mg/mL	n/a	Water-soluble iodide salt +	n/a

Compound	CAS no.	MW (g/Mol)	Solubility in water #	Log K <sub>ow</sub> #	Stability and biodegradability	Particle adsorption in water #
Nicotine	54-11-5	163.23	1 g/ml	1.17	Lacks functional groups for hydrolysis. Volatilisation not expected #	Not expected
Paracetamol	103-90-2	151.165	14 g/l (20 °C)	0.46	Lacks functional groups for hydrolysis #. Readily biodegradable *	Not expected
Paraquat	1910-42-5	257.16	700 mg/ml (20 °C)	- 4.22	Hydrolysis and direct photolysis not expected #	Expected
Polychlorinated biphenyl 180	35065-29-3	395.31	Insoluble	n/a	Chemically very inert #	n/a
Rifampicin	13292-46-1	822.95	1400 mg/l (25 °C)	4.24	10 mg/ml in DMSO at 20 °C, pH 8: sTabelle for about 8 m +. Not readily biodegradable *	n/a
Rotenone	83-79-4	394.42	0.17 mg/l (25 °C)	4.10	Half-life 10.3 d (cold), 0.94 d (warm water). Photolysis half-life: 191 d (summer, 2 m depth), 21 h (surface). (Very) high bioaccumulation #	Expected
Sulfisoxazole	127-69-5	267.30	300 mg/l (37 °C)	1.01	No hydrolysis of structurally similar compound. Direct photodegradation of anionic form #	Not expected
Taxol	33069-62-4	853.92	Insoluble	n/a	Not readily biodegradable *	n/a
Tebuconazole	107534-96-3	307.82	36 mg/l (20 °C, pH 5-9)	3.70	Lacks functional groups for hydrolysis and experiments show stability in pure water #	Expected
Thiacloprid	111988-49-9	252.72	185 mg/l (20 °C)	1.26	Half-life: 10-63 d #	Expected
Thiamethoxam	153719-23-4	291.71	4.1 g/l (25 °C)	-0.13	Hydrolytically stable at pH 5. Half-life: 200-300 days. At pH 9: half-life a few days #	Not expected

Compound	CAS no.	MW (g/Mol)	Solubility in water #	Log K <sub>ow</sub> #	Stability and biodegradability	Particle adsorption in water #
Tolbutamide	64-77-7	270.35	109 mg/l (37 °C)	2.34	Not readily biodegradable *	n/a
Triphenylphosphate	99-66-1	326.29	1.9 mg/l (25 °C)	4.59	Biodegradation half-life: 2-4 d. Volatilisation from surface water: 20-152 d. Bioconcentration high, factor: 132-573 #	Not expected

\* Canadian Institute of Health research - DrugBank (version 5.1.1, released: 03.07.2018): <https://www.drugbank.ca/drugs>

# US National Library of Medicine – ToxNet: <https://www.nlm.nih.gov/toxnet>

+ Sigma Aldrich specification sheets: <https://www.sigmaaldrich.com>

‡ National Center for Biotechnology Information – PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

§ The good sent company: <http://thegoodscentcompany.com/>

“ US Environmental Protection Agency – CompTox: <https://comptox.epa.gov>

^ National Pesticide Information Centre – Oregon State University: [www.npic.orst.edu](http://www.npic.orst.edu)

\* CarboSynth Safety data sheet: <https://www.carbosynth.com>

n/a: hier konnten keine Informationen gefunden werden

Annex I, Tabelle 3. Details der Probelanalyse

Compound	Accurate Mass	Parent > Daughter transition	Cone voltage [V]	Collision energy [eV]	UHPLC gradient or GC	Limit of detection
Acetamiprid	222.67	224.04>126.93	21	20	Formic_FAST_B2	0.75uM
Clothianidin	249.68	250.91>169.97	14	10	Formic_FAST_B2	0.3uM
Dinotefuran	202.21	203.05>129.03	14	10	Formic_FAST_B2	0.75uM
Imidacloprid	255.66	256.99>175.97	14	20	Formic_FAST_B2	0.75uM
Nicotine	162.23	163.06>129.99	42	20	Acetate_FAST_B2	0.3uM
Thiacloprid	252.72	254.00>126.9	21	30	Formic_FAST_B2	0.75uM

## ANNEX II

Annex II, Tabelle 1. Übersicht über die Anwendung(en) weiterer Substanzen, betroffene(s) Organ(e) und biologische Wirkungen, wie in der Literatur beschrieben

Compound name	Chemical class	Application(s)	Affected organ(s)	Molecular/Biochemical effect(s)
Carbamazepine	Dibenzazepine	Anti-epileptic drug	Liver, kidney	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serotonin release increase (Kawata u. a., 2001)</li> <li>• Use-dependent sodium channel inactivation (Kawata u. a., 2001)</li> <li>• GABA<math>\beta</math> receptor involvement (Rogawski u. a., 2016)</li> </ul>
Copper (II) sulphate pentahydrate	Heavy metal	Fungicide	Neuronal system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chromosomal aberrations (Fahmy, 2000)</li> <li>• Oxidative stress promotion (Bogdanova u. a., 2002)</li> </ul>
Dibutyl maleate	Ester	Plasticiser	No information available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allergic contact dermatitis (Sasseville u. a., 2009)</li> </ul>
3,4-DCA	Aromatic compound	Solvent, dye, pesticide	Liver, kidney	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nephrotoxic and genotoxic (Pascal-Lorber u. a., 2003)</li> </ul>
DMSO	Organosulfur	Solvent	Eyes, nervous system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Developmental neurotoxin (Hanslick u. a., 2009)</li> <li>• Retinal apoptosis induction (Galvao u. a., 2014)</li> </ul>
2,2-Dimethylvaleric acid	Fatty acid	VPA metabolite/ analogue	Liver, nervous system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GABA transaminase inhibition In vitro-(Maitre u. a., 1974)</li> </ul>
DNOC	Phenol	Herbicide	Liver and heart	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxidative metabolism increase (Parker u. a., 1951)</li> <li>• Cell membrane disruption (World Health Organisation, 2000)</li> </ul>
2,4-DNP	Phenol	Pesticide, antiseptic	Bone marrow, nervous system, heart, liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uncoupling of oxidative phosphorylation (Grundlingh u. a., 2011)</li> <li>• Glycolysis stimulation (Grundlingh u. a., 2011)</li> </ul>
Ethanol	Alcohol	Solvent, disinfectant	Neuronal system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GABA receptor interaction (Kumar u. a., 2009)</li> <li>• Serotonin receptor interaction (Kumar u. a., 2009)</li> <li>• AChE interaction (Lovinger, 1999)</li> <li>• N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor functioning inhibition (Lovinger, 1999)</li> </ul>

Compound name	Chemical class	Application(s)	Affected organ(s)	Molecular/Biochemical effect(s)
2-Ethylbutyric acid	Fatty acid	VPA metabolite/ analogue	No published effects available on affected organs or biological effects. Substance selected for structural similarity to valproic acid.	
2-Ethylhexanoic acid	Fatty acid	VPA metabolite, artificial flavouring, preserving agent	Liver, kidney, neuronal system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peroxisome proliferation (Pennanen u. a., 2000)</li> <li>• Urea cycle inhibition (Manninen u. a., 1989)</li> <li>• PPAR<math>\alpha</math> activation (Maloney und Waxman, 1999)</li> <li>• CYP induction (Hamdoune u. a., 1995)</li> <li>• HDAC inhibition (Gurvich u. a., 2005)</li> </ul>
Hexanoic acid	Fatty acid	VPA metabolite/ analogue, artificial flavouring	Liver, intestines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fatty acid synthase promotion (Roncero und Goodridge, 1992)</li> <li>• Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (Clayton u. a., 2001)</li> <li>• Non-alcoholic fatty liver disease (Raman u. a., 2013)</li> </ul>
Luviquat	Polymer	Preservative	No published effects available on affected organs or biological effects	
Malathion	Organophosphate	Insecticide	Liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AChE inhibition (Baker u. a., 1978)</li> </ul>
Merquat	Polymer	Preservative	Liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allergic contact dermatitis (Ginkel und Rundervoort, 2010)</li> </ul>
2-Methylhexanoic acid	Fatty acid	VPA metabolite/ analogue	No published effects available on affected organs or biological effects. Substance selected for structural similarity to valproic acid.	
6-Methyl-5-heptene-2-one	Aliphatic ketone	Artificial flavouring	No published effects available on affected organs or biological effects.	
Methylmercury (II) chloride	Heavy metal	Industrial use (banned)	Kidney, liver, nervous system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CYP expression modification (Strungaru u. a., 2018)</li> <li>• Formation/disruption of microtubule assembly (Zychowicz u. a., 2014)</li> <li>• Retinal damage and visual impairment (Caballero u. a., 2017)</li> <li>• Oxidative stress promotion (Glaser u. a., 2010)</li> <li>• Lipid peroxidation involvement (Strungaru u. a., 2018)</li> <li>• Glutathione level reduction (Glaser u. a., 2010)</li> </ul>

Compound name	Chemical class	Application(s)	Affected organ(s)	Molecular/Biochemical effect(s)
2-Methylpentanoic acid	Fatty acid	VPA metabolite/ analogue	No published effects available on affected organs or biological effects. Substance selected for structural similarity to valproic acid.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Intracellular calcium homeostasis impairment (Strungaru u. a., 2018)</li> </ul>
1-Octanol	Alcohol	Solvent, artificial flavouring, biocide	Nervous system	<ul style="list-style-type: none"> <li>Potential <math>\gamma</math>-aminobutyric acid interaction (Bushara u. a., 2004)</li> </ul>
4-Pentenoic acid	Fatty acid	VPA analogue/ metabolite, artificial flavouring	Liver, kidney	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fatty acid oxidation inhibition (Brendel u. a., 1969)</li> <li>HDAC inhibition (Gurvich u. a., 2005)</li> <li>Microvascular steatosis induction (Tang u. a., 1995)</li> </ul>
Prochloraz	Phenol	Fungicide	Liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>Androgen and oestrogen receptor antagonist (Vinggaard u. a., 2006)</li> <li>Aryl hydrocarbon receptor agonist (Vinggaard u. a., 2006)</li> <li>Steroidogenesis pathway inhibitor (e.g. CYP17A1) (Vinggaard u. a., 2006)</li> </ul>
2-Propylheptanoic acid	Fatty acid	VPA metabolite	No published effects available on affected organs or biological effects. Substance selected for structural similarity to valproic acid.	
Sodium chloride	Metal halide	Salt	Kidney	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increased blood pressure (McCallum u. a., 2015)</li> <li>Renal vasoconstriction and glomerular filtration rate decrease (McCallum u. a., 2015)</li> </ul>
STS	Ester	Surfactant, drug	Neuronal system	<ul style="list-style-type: none"> <li>Membrane permeability increased (lipid solubilisation) (Cooley-Andrade u. a., 2016)</li> </ul>
Triclosan	Phenol	Antibacterial, anti-fungal		<ul style="list-style-type: none"> <li>Fatty acid synthesis inhibition (in bacteria) (World Health Organisation, 2006)</li> <li>Endocrine disruptor (Huang u. a., 2018)</li> <li>Altered thyroid hormone metabolism (Stoker u. a., 2010)</li> </ul>
Triethylene glycol	Alcohol	Plasticiser, disinfectant	Kidney, neuronal system	<ul style="list-style-type: none"> <li>Craniofacial defects and axial skeletal dysplasia (Ballantyne und Snellings, 2005)</li> <li>Metabolic acidosis (Vassiliadis u. a., 1999)</li> </ul>

<b>Compound name</b>	<b>Chemical class</b>	<b>Application(s)</b>	<b>Affected organ(s)</b>	<b>Molecular/Biochemical effect(s)</b>
2.3.6-Trimethyl phenol	Phenol	Artificial flavouring	No information available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Base compound of vitamin E (Ichikawa u. a., 1979)</li> </ul>
4-ene-Valproic acid	Fatty acid	VPA metabolite	Liver, kidney	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fatty acid oxidation inhibition (Tang u. a., 1995)</li> <li>• Fanconi syndrome promotion (Gougoux u. a., 1989)</li> <li>• Microvascular steatosis induction (Tang u. a., 1995)</li> </ul>
Valproic acid	Fatty acid	Anti-epileptic drug	Liver, nervous system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HDAC inhibition (Chateauvieux u. a., 2010; Godhe-Puranik u. a., 2013)</li> <li>• Sodium channel protein inhibition (Chateauvieux u. a., 2010; Godhe-Puranik u. a., 2013)</li> <li>• GABA transaminase inhibition (Chateauvieux u. a., 2010; Godhe-Puranik u. a., 2013)</li> </ul>
Zinc pyrithione	Pyrithione	Fungicide	Bacterial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Membrane pump disruption (Chandler und Segel, 1978)</li> </ul>

Annex II, Tabelle 2. Informationen über die weiteren Substanzen zur Stabilität und Löslichkeit, die aus verschiedenen Quellen stammen

Compound	CAS no.	MW (g/Mol)	Solubility in water #	Log K <sub>ow</sub> #	Stability and biodegradability	Particle adsorption in Water #
Carbamazepine		326.27	17.7 mg/l, 25 °C	2.45	Half-life: 63 d (lake). Bioconcentration in aquatic organisms is low. Susceptible to photolysis. Hydrolysis not expected #	Expected
Copper II sulphate pentahydrate		249.68	≥ 100 mg/ml, 25 °C	n/a	n/a	n/a
Dibutyl maleate		228.29	n/a	n/a	n/a	n/a
3,4-DCA		162.01	1 mg/ml, 20 °C	2.91	Photolysis: 0.071 (summer) and 0.033/h (winter). Half-life: 10 (summer) and 21 h (winter). Surface water volatilisation expected half-life: 30 (river) and 21 d (lake). Bioconcentration factor moderate: 94.7 #	Expected
DMSO		78.13	1000 g/l, 20 °C	- 1.35	Bioconcentration low in aquatic organisms. STable to hydrolysis in water #	Not expected
2,2-Dimethylvaleric acid		130.19	n/a	2.43	No rapid reaction with water †	n/a
DNOC		198.13	198 mg/l, 20 °C	2.13	Volatilisation half-life: 37 (lake) and 273 d (river). Bioaccumulation in aquatic organisms low. Photolysis half-life in water at 20 °C 253 h #	Expected
2,4-DNPI		184.11	2790 mg/l, 20 °C	1.67	Biodegradation half-life: 68 (aerobic) and 2.8 d (anaerobic). Bioconcentration in aquatic organisms low #	Not expected
Ethanol		46.07	>100 mg/ml, 20 °C	- 0.31	Surface water volatilisation half-life: 5 (river) and 39 d (lake). Bioconcentration factor low: 3 #	Not expected
2-Ethylbutyric acid		116.16	18 g/l, 20 °C	1.68	Stable at temperatures between 2 and 8 °C. Not considered to be persistent, bioaccumulative or toxic at levels of 0.1% or higher	n/a
2-Ethylhexanoic acid		144.21	1.4 g/l, 25 °C	2.64	Estimated volatilisation half-life: 15 (river) and 120 d (lake). Estimated bioconcentration factor low: 3 #	Expected

Compound	CAS no.	MW (g/Mol)	Solubility in water #	Log K <sub>ow</sub> #	Stability and biodegradability	Particle adsorption in Water #
Hexanoic acid		116.16	10 mg/ml, 22 °C	1.92	Susceptible to biodegradation in water #.	Not expected
Luviquat		470.59	n/a	n/a	n/a	n/a
Malathion		330.35	143 mg/l (20 °C)	2.36	Degradation half-life: 1.03 – 3.93 d. Photodegradation may compete with hydrolysis and biodegradation (8.9 h). Volatilisation from surface not expected. Bioconcentration low	Expected
Merquat		161.67	n/a	- 2.49	n/a	n/a
2-Methylhexanoic acid		130.19	1.8 g/l (25 °C) §	2.47	Stable at temperatures between 2 and 8 °C +	n/a
6-Methyl-5-heptene-2-one		126.20	Insoluble	n/a	n/a	n/a
Methylmercury (II) chloride		251.08	< 0.1 mg/ml (21 °C)	0.41	n/a	n/a
2-Methylpentanoic acid		116.16	15 g/l (20 °C) §	1.80 §	n/a	n/a
1-Octanol		130.23	540 mg/l (25 °C)	3.00	Surface water volatilisation half-life: 43 h (river) and 1.7 d (lake). Bioconcentration potential moderate. Hydrolysis not expected #	Not expected
4-Pentenoic acid		100.12	Insoluble †	1.42	Estimated bioconcentration factor low: 7 #	Expected
Prochloraz		376.66	0.009 mg/ml	3.78	n/a	n/a
2-Propylheptanoic acid		172.27	n/a	3.20 “	Stable at temperatures between 2 and 8 °C. Not considered to be persistent, bioaccumulative or toxic at levels of 0.1% or higher +	

Compound	CAS no.	MW (g/Mol)	Solubility in water #	Log K <sub>ow</sub> #	Stability and biodegradability	Particle adsorption in Water #
Sodium chloride		58.443	358 mg/l (25 °C)	n/a	Store in the dark and at low temperatures +	No reactions observed
Sodium tetradecyl sulphate		316.43	n/a	n/a	n/a	n/a
Triclosan		289.54	12 g/l (20 °C) +	4.76 +	Stable at temperatures between 2 and 8 °C +	n/a
Triethylene glycol		150.17	100 mg/ml (20 °C)	- 1.98	Low bioaccumulation in aquatic organisms. Volatilization from surface water not expected #	Not expected
2,3,6-Trimethyl phenol		136.19	1.58 mg/l (25 °C)	2.65	Volatilization from surface water expected, in river and lakes 11 and 84 d half-lives respectively. Bioconcentration factor: 60 suggests moderate bioaccumulation. Hydrolysis not expected #	Expected
4-ene-valproic acid		142.20	4.11 mg/ml *	2.82	Stable at temperatures between 2 and 8 °C*	n/a
VPA		144.21	1.3 mg/l	2.75	No volatilisation in anionic form, pH 5-9. Lacks functional groups for hydrolysis #. Readily biodegradable *	n/a
Zinc pyritone		317.70	3 mg/mL	0.9 +	Biodegradation half-life: 2-22 (aerobic) and 0.5 h (anaerobic). Bioconcentration factor high: 160-200. Very photodegradable #	Expected

\* Canadian Institute of Health research - DrugBank (version 5.1.1, released: 03.07.2018): <https://www.drugbank.ca/drugs>

# US National Library of Medicine – ToxNet: <https://www.nlm.nih.gov/toxnet>

+ Sigma Aldrich specification sheets: <https://www.sigmaaldrich.com>

‡ National Center for Biotechnology Information – PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

§ The good sent company: <http://thegoodscentcompany.com/>

“ US Environmental Protection Agency – CompTox: <https://comptox.epa.gov>

^ National Pesticide Information Centre – Oregon State University: [www.npic.orst.edu](http://www.npic.orst.edu)

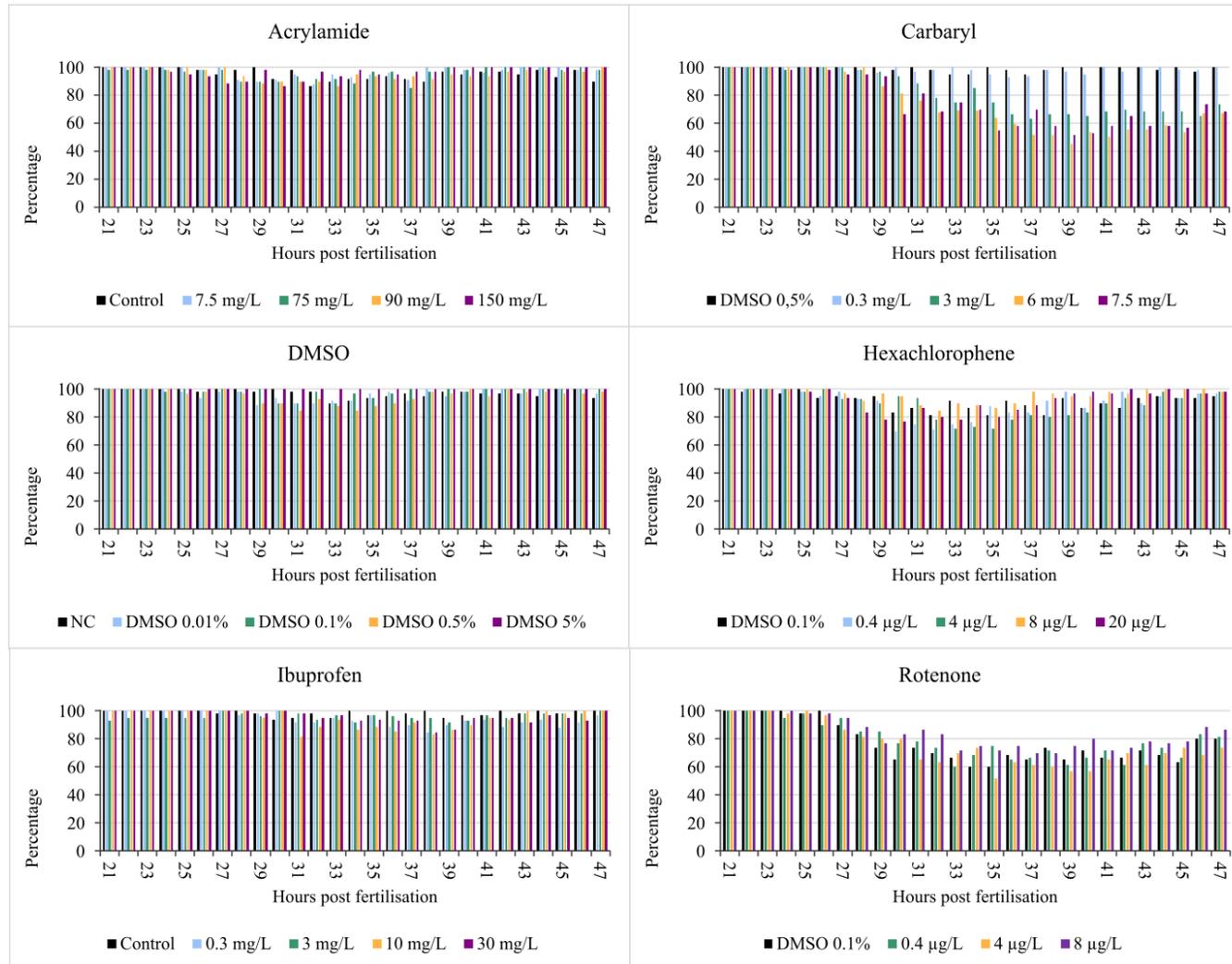
\* CarboSynth Safety data sheet: <https://www.carbosynth.com>

n/a: hier konnten keine Informationen gefunden werden

Annex II, Tabelle 3. Kamerakonfiguration und Aufnahmeeinstellungen der Noldus® Software für den Coiling Assay und dem basalen Schwimmverhaltens Assay

	<b>Setting</b>	<b>Parameter</b>
Coiling assay	<b>Video settings</b>	
	Basler acA1920-155um	1600x1200
	Gain Auto	Off
	Gain Selector	All
	Gain	1,00000
	Black Level Selector	All
	Black Level	0,00000
	Gamma	1,00000
	Digital shift	4
	<b>Detection settings</b>	
	Activity onset	2%
	Activity offset	0.5%
Minimum inter peak interval	100 ms	
Minimum peak duration	0 ms	
Basal swimming assay	<b>Video settings</b>	
	Basler acA1300-60gm	1280x960
	Gain Auto	Off
	Gain Selector	Analog All
	Gain (Raw)	0
	Black Level Selector	All
	Black Level (Raw)	50
	Gamma Enable	Disabled
	Gamma Selector	User
	Gamma	1
	Digital Shift	1
	<b>Detection Settings</b>	
	Method	DanioVision
	Detection Sensitivity	160
	Activity Threshold	100
Activity Background noise filter	5	
Compression artifacts filter	On	

# ANNEX III



Annex III, Abbildung 1. Prozentualer Anteil der analysierten Embryonen pro Konzentration und Zeitpunkt, die für die weitere statistische Analyse lebensfähig waren

Annex III, Tabelle 1. *p*-Werte des DART Coiling Assays. Mindestens 2 Replikate müssen ein Signifikanzniveau angegeben haben. Bei Replikaten, die das gleiche Signifikanzniveau liefern, wurde der Wert nur einmal notiert

	Mean burst-duration			Mean burst-count-per-minute		
	Konzentration	hpf	<i>p</i> -Wert(e)	Konzentration	hpf	<i>p</i> -Wert(e)
Acrylamid	90 mg/l	45	≤0.05, ≤0.01	90 mg/l	42	≤0.05
	150 mg/l	45	≤0.01, ≤0.001		43	≤0.05, ≤0.01
					44	≤0.05, ≤0.01
				150 mg/l	38-40	≤0.05, ≤0.01
					41	≤0.05
					45	≤0.01
Carbaryl	3 mg/l	24, 37	≤0.05, ≤0.001	3 mg/l	24	≤0.01, ≤0.0001
	6 mg/l	35	≤0.05		27	≤0.05
		37	≤0.05, ≤0.0001		38	≤0.05, ≤0.01
	7.5 mg/l	25	≤0.05, ≤0.001	6 mg/l	24	≤0.01, ≤0.001
					26	≤0.01
					27	≤0.05, ≤0.01
					28	≤0.05
					45	≤0.01
				7.5 mg/l	23	≤0.01
					24	≤0.05, ≤0.01, ≤0.0001
				31	≤0.05	
				38, 39, 43	≤0.05, ≤0.01	
Hex	20 µg/l	22	≤0.05	8 µg/l	42	≤0.05
				20 µg/l	22	≤0.05, ≤0.001
					42	≤0.05, ≤0.01

	Mean burst-duration			Mean burst-count-per-minute		
	Konzentration	hpf	<i>p</i> -Wert(e)	Konzentration	hpf	<i>p</i> -Wert(e)
<b>Ibuprofen</b>	10 mg/l	30	≤0.05, ≤0.01	10 mg/l	36	≤0.01, ≤0.001
	30 mg/l	24	≤0.05, ≤0.01	30 mg/l	37	≤0.05, ≤0.01, ≤0.0001
		30	≤0.01		38	≤0.05, ≤0.01
		44	≤0.05, ≤0.0001		39	≤0.01
		47	≤0.01		40	≤0.001, ≤0.0001
					42	≤0.001, ≤0.0001
			45		≤0.05, ≤0.01	
			47		≤0.05, .<0.0001	
			24, 30		≤0.05, ≤0.01, ≤0.0001	
			25		≤0.05, ≤0.001	
			26		≤0.01, ≤0.001	
			27		≤0.001	
			28, 36, 39, 47		≤0.0001	
			29, 43, 44		≤0.01, ≤0.0001	
		38, 42	≤0.001, ≤0.0001			
		40, 41, 46	≤0.0001			
		45	≤0.001, ≤0.0001			
<b>Rotenon</b>	8 µg/l	26	≤0.01, ≤0.0001	8 µg/l	21	≤0.05, ≤0.0001
		27	≤0.01	22	≤0.0001	
				23, 26, 46, 47	≤0.01, ≤0.0001	
				27	<0.01	

## ANNEX IV

Annex IV, Tabelle 1. *p*-Werte der separierten Embryos im Coiling-Assay. Mindestens 2 Replikate müssen ein Signifikanzniveau angegeben haben. Bei Replikaten, die das gleiche Signifikanzniveau aufweisen, wurde der Wert nur einmal notiert

	Mean burst-duration			Mean burst-count-per-minute		
	Konzentration	hpf	<i>p</i> -Wert(e)	Konzentration	hpf	<i>p</i> -Wert(e)
<b>Group-piert</b>	8 µg/l	26	≤0.01, ≤0.0001	8 µg/l	21	≤0.05, ≤0.0001
		27	≤0.01		22	≤0.0001
					23, 26, 46, 47	≤0.01, ≤0.0001
					27	<0.01
<b>Separiert</b>	0.4 µg/l	22	≤0.05, ≤0.001	0.4 µg/l	22	≤0.01, ≤0.0001
	4 µg/l	21	≤0.05			

Annex IV, Tabelle 2. p-Werte der 37-zu-28 in den Coiling Assay-Replikaten, die im Wilcoxon Matched-Pairs Signed Rank Test (n=3, 20 Individuen pro Replikat) statistisch notiert wurden. Mindestens 2 Replikate müssen ein Signifikanzniveau angezeigt haben. Bei den Läufen, die das gleiche Signifikanzniveau lieferten, wurde der Wert nur einmal notiert

	<b>Burst-count-per-minute</b>		<b>Mean burst-duration [seconds]</b>	
	<b>Gruppiert</b>	<b>Separiert</b>	<b>Gruppiert</b>	<b>Separiert</b>
<b>0.1% DMSO</b>	≤0.05		≤0.01	
<b>1.0 µg/l</b>			≤0.05	
<b>10.1 µg/l</b>		≤0.05		
<b>20.3 µg/l</b>	≤0.01	≤0.05		
<b>Overall</b>	≤0.0001	≤0.05	≤0.01	

## ANNEX V

Annex V, Tabelle 1. Gemessene Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der Probenanalyse (n=3)

Nominalkonz. [ $\mu\text{M}$ ]	6.25		12.5		25		50		100	
	fresh	24 h	fresh	24 h	fresh	24 h	fresh	24 h	fresh	24 h
Acetamidrid*	1.95 $\pm$ 0.13	2.20 $\pm$ 0.20	2.47 $\pm$ 0.49	3.34 $\pm$ 0.64	1.05 $\pm$ 2.12	7.52 $\pm$ 0.13	26.03 $\pm$ 0.26	35.21 $\pm$ 1.64	74.56 $\pm$ 2.79	74.67 $\pm$ 10.66
Clothianidin	-0.02 $\pm$ 0.05	0.05 $\pm$ 0.08	0.07 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.15	1.57 $\pm$ 0.16	1.77 $\pm$ 0.31	2.75 $\pm$ 0.16
Dinotefuran*	1.23 $\pm$ 0.57	3.30 $\pm$ 0.65	2.71 $\pm$ 0.24	4.65 $\pm$ 0.13	13.48 $\pm$ 1.86	20.17 $\pm$ 0.89	34.72 $\pm$ 0.30	36.64 $\pm$ 4.82	71.12 $\pm$ 2.37	70.98 $\pm$ 11.82
Imidacloprid	1.26 $\pm$ 0.04	2.53 $\pm$ 0.19	3.05 $\pm$ 0.41	4.03 $\pm$ 0.25	3.64 $\pm$ 0.59	7.41 $\pm$ 0.29	7.45 $\pm$ 0.96	10.95 $\pm$ 0.39	13.53 $\pm$ 1.77	15.80 $\pm$ 0.38
Nikotin	2.38 $\pm$ 0.50	1.57 $\pm$ 0.22	4.41 $\pm$ 1.39	3.64 $\pm$ 0.55	15.93 $\pm$ 3.22	8.67 $\pm$ 1.93	43.84 $\pm$ 9.07	22.62 $\pm$ 3.35	73.65 $\pm$ 16.18	51.49 $\pm$ 4.38
Thiacloprid	1.62 $\pm$ 0.5	1.97 $\pm$ 0.20	2.64 $\pm$ 0.54	3.88 $\pm$ 0.29	3.52 $\pm$ 0.76	5.40 $\pm$ 0.46	42.94 $\pm$ 13.33	118.84 $\pm$ 8.26	156.80 $\pm$ 26.45	197.90 $\pm$ 22.02
Thiametho- xam*	1.56 $\pm$ 0.00	2.51 $\pm$ 0.90	2.69 $\pm$ 0.09	3.67 $\pm$ 0.31	3.92 $\pm$ 1.15	5.34 $\pm$ 1.05	31.99 $\pm$ 6.10	89.86 $\pm$ 11.88	98.60 $\pm$ 12.90	179.25 $\pm$ 16.54

Annex V, Tabelle 2. *p*-Werte des Coiling Assays der Neonicotinoide. Mindestens 2 Replikate mussten eine statistische Signifikanz aufweisen. Wenn zwei Replikate den Gleichen Wert hatten wurde dieser nur ein Mal aufgeführt

	Mean burst-duration			Mean burst-count-per-minute		
	Konzentration [mg/l]	hpf	<i>p</i> -Wert(e)	Konzentration [mg/l]	hpf	<i>p</i> -Wert(e)
Nikotin	0.2	39, 40	≤0.001, ≤0.01, ≤0.05	0.2	30, 34	≤0.01, ≤0.05
		41-45	≤0.001, ≤0.01		36	≤0.01
	0.4	23	≤0.001, ≤0.01	0.4	37, 38, 40-42, 47	≤0.001
		24	≤0.001, ≤0.05		39, 43, 46	≤0.001, ≤0.05
		28, 38, 39, 41, 46	≤0.01, ≤0.05		44, 45	≤0.001, ≤0.01
		40, 45	≤0.01		23, 25, 40-47	≤0.001
		42-44	≤0.001, ≤0.01, ≤0.05		24, 38, 39	≤0.001, ≤0.01
	2	23, 30, 38, 45, 46	≤0.001, ≤0.01	2	33	≤0.01, ≤0.05
		24-29, 31, 39-44, 47	≤0.001		35	≤0.05
	4	23-47	≤0.001	4	37	≤0.001, ≤0.01, ≤0.05
					23-26	≤0.001
					27, 34, 45-47	≤0.001, ≤0.01
					33	≤0.01
					35, 44	≤0.001, ≤0.05
					36	≤0.001, ≤0.01, ≤0.05
					37	≤0.05
					23, 40	≤0.001, ≤0.05
					24-28	≤0.001
					29-33	≤0.001, ≤0.01
	34	≤0.001, ≤0.01, ≤0.05				

	Mean burst-duration			Mean burst-count-per-minute		
	Konzentration [mg/l]	hpf	<i>p</i> -Wert(e)	Konzentration [mg/l]	hpf	<i>p</i> -Wert(e)
					40-42 43, 44	≤0.01, ≤0.05 ≤0.05
Acetamidiprid*	5.6	31	≤0.05	0.6	23	≤0.001
		39	≤0.05		23	≤0.001
		40	≤0.001		24	≤0.01, ≤0.001
	11.1	40 - 42	≤0.05	5.6	33	≤0.05
		44	≤0.01		38, 39, 43, 45	≤0.05
	22.5	38	≤0.001	11.1	40, 42	≤0.01
		39 - 41	≤0.001		44, 46	0.001
		42, 44	≤0.01		23	≤0.01, ≤0.001
		45	≤0.05		24	≤0.001
						42, 45
				22.5	44, 46	≤0.001
					23	≤0.001, ≤0.05
				24	≤0.001, ≤0.01, ≤0.05	
				25	≤0.01	
				33, 34	≤0.001, ≤0,05	
				44	≤0.01	
Imidacloprid*	0.6	24	≤0.001	0.6	24	≤0.001, ≤0.01
		28	≤0.01, ≤0.05		25	≤0.001
		29	≤0.001, ≤0.01		47	≤0.01
	6.4	24	≤0.001, ≤ 0.05	6.4	25	≤0.001
		25	≤0.05, ≤ 0.001		27	≤0.001, ≤0.05

	Mean burst-duration			Mean burst-count-per-minute		
	Konzentration [mg/l]	hpf	p-Wert(e)	Konzentration [mg/l]	hpf	p-Wert(e)
	12.8	27, 35	$\leq 0.01, \leq 0.05$		29	$\leq 0.05$
		29	$\leq 0.001, \leq 0.05$		38	$\leq 0.01$
		24	$\leq 0.001, \leq 0.01, \leq 0.05$		44, 45	$\leq 0.05$
		40	$\leq 0.01$		47	$\leq 0.001$
	25.6	24	$\leq 0.001, \leq 0.01$	12.8	24	$\leq 0.01$
		25	$\leq 0.001, \leq 0.01$		31	$\leq 0.01, \leq 0.05$
		29	$\leq 0.001, \leq 0.05$	38	$\leq 0.01$	
		38, 39, 43, 46	$\leq 0.01$	44	$\leq 0.05$	
		40, 44, 45, 37	$\leq 0.001$	47	$\leq 0.001$	
		41	$\leq 0.05$	25.6	24	$\leq 0.001$
					31	$\leq 0.001, \leq 0.05$
					38	$\leq 0.01$
			40		$\leq 0.05$	
				41	$\leq 0.001$	
Thiacloprid	0.6	35	$\leq 0.01, \leq 0.05$	12.6	24	$\leq 0.001, \leq 0.05$
		42	$\leq 0.05$	25.3	24	$\leq 0.05$
	6.3	39	$\leq 0.05$			
		41	$\leq 0.001, \leq 0.05$			
	12.6	38	$\leq 0.05$			
		39, 41	$\leq 0.001, \leq 0.05$			
		40	$\leq 0.001$			
		42	$\leq 0.001, \leq 0.01$			
		43	$\leq 0.001, \leq 0.01, \leq 0.05$			
		44	$\leq 0.01, \leq 0.05$			

	Mean burst-duration			Mean burst-count-per-minute		
	Konzentration [mg/l]	hpf	<i>p</i> -Wert(e)	Konzentration [mg/l]	hpf	<i>p</i> -Wert(e)
	25.3	35, 46 37 38, 41, 42 39, 40, 43 44 45, 47	≤0.001, ≤0.05 ≤0.05 ≤0.001 ≤0.001, ≤0.01 ≤0.01 ≤0.01, ≤0.05			

\*: Nach 37 hpf sind die Werte auf 1 Replikat basierend (Grau)

Annex V, Tabelle 3. *p*-Wert des basalen Schwimmverhaltens Assays für Acetamidrid (n=2)

Zurückgelegte Distanz			Frequency Mittelwert		
Konzentration	hpf	<i>p</i> -Werte	Konzentration	hpf	<i>p</i> -Werte
22.5 mg/l	100-104	≤0.05, ≤0.01	22.5 mg/l	110-114	≤0.05
	110-114	≤0.05, ≤0.001			

Annex V, Tabelle 4. Zusammenfassung aller Zitate der Neonicotinoidendiskussion

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
<b>Acetamiprid</b>				
Wildtype (AB) zebrafish	<p>Reared at 28 °C, with 14/10 h light/dark cycle. Eggs were collected and reared in embryo medium before use.</p> <p><u>Clutch 1</u>: embryos at 6 hpf were exposed to acetamiprid in 200 µl solution in 96-well plate until 12 hpf.</p> <p><u>Clutch 2-5</u>: 20 embryos per replicate raised in 6-well plates with 5 ml solution (54, 107, 263, 443, 537, 760, and 974 mg/l) for 12 hours without medium renewal. Heart rate measured at 48, 60 and 72 hpf in 10 second videos. Body length measured after 120 h, coiling examined at 17 and 27 hpf, touch response examined at 27, 36, and 48 hpf (after dechoriation).</p>	<p><u>Morphology</u>: mortality, LC, malformations, hatching, heart rate, and body length.</p> <p><u>Behaviour</u>: spontaneous tail coiling and touch response.</p>	<p><u>Morphology</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 374 mg/l induced significant mortality at 120 hpf., 760 mg/l induced complete mortality. Hatching only affected &gt;547 mg/l.</li> <li>• 120 hpf LC<sub>50</sub>: 518 mg/l</li> <li>• 120 hpf EC<sub>50</sub>: 323 mg/l</li> <li>• Observed effects: bent spine, uninflated swim bladder, pericardial and yolk sac oedema.</li> <li>• &gt;107 mg/l significantly reduced heart rate at 48, 60 and 72 hpf.</li> <li>• Body length decreased in dose-dependent manner, starting at 54 mg/l.</li> </ul> <p><u>Behaviour</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exposure delayed onset of spontaneous movement, inhibiting response in &gt;760 mg/l.</li> <li>• Only &lt;760 mg/l recovered. No movement recorded at all for 974 mg/l individuals.</li> <li>• Tail and head touch less sensitive, with head touch response being more pronounced than tail touch after treatment with 974 mg/l.</li> </ul>	(Ma u. a., 2019)
ICR mice	<p>10-week-old mice housed in 24 °C, 55% humidity and a 12 light/dark cycle. Acetamiprid administered <i>via</i> oral gavage (5 ml/kg body weight) for varying times between gestational days (GD) 3 and 18. Pregnant mice were sacrificed and embryos of postnatal day (PND) 14 were examined.</p>	<p><u>Histology</u>: foetal tissue &amp; weight</p> <p><u>Immunohistochemistry</u>: β-tubulin, anti-Ki67, bromodeoxyuridine, anti-bromodeoxyuridine, anti-lba1, antiCD11b, and anto-CD206.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absolute brain weight of new-born male pups was significantly lower after acetamiprid treatment.</li> <li>• Cortical plate thickness was significantly reduced in pups of maternal mice treated from GD 6 to 13.</li> <li>• Significant decrease in cell cycle exit in 5 mg/kg treatment group, linking cortical plate hypoplasia to decreased neurogenesis.</li> <li>• Prenatal exposure altered neuronal distribution but not number of neurons on PND 14.</li> </ul>	(Kagawa und Nagao, 2018)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
C57BL/6J mice	Housed at 24 °C, 50% humidity with a 12 h light/dark cycle. 0, 1, or 10 mg/kg acetamiprid were administered by oral gavage in water from GD 6 to PND 21. Pups were weaned 2-3 h after last dosing on day 21. Male sex behaviour towards hormone treated females was tested 12-14 days after final dosing for 3 weeks (in weekly 30-minute trials). 5-7 days after male sex behaviour test, aggressive behaviour towards male intruder mice was tested weekly for 3 weeks in 9 trials of 15 minutes. 12-14-week-old females were ovariectomised and 2 weeks later tested for sexual behaviour towards experienced ICR/JCL male mice (three trials). Light-dark test (LDT) test examined emotional behaviour in enclosed dark and open-top light compartments.	<u>Morphology:</u> Body weight (at birth, at meaning and at 23-26 weeks of age), brain weight (at 21 days of age) <u>Behaviour:</u> male sexual behaviour, male aggressive behaviour, female sex behaviour, LDT test, and behavioural flexibility. <u>Immunohistochemistry:</u> for plasma testosterone	<ul style="list-style-type: none"> <li>• On PND 14, pups showed increase in number of amoeboid-type microglia, without showing changes in numbers of ramified/transition-type microglia and total microglia.</li> <li>• Number of sexual behaviours of males significantly increased in low-dose group (especially mean mount numbers)</li> <li>• Aggression level in low-dose group males significantly increased in total duration and number of bouts compared to high-dose and control group</li> <li>• Low- and high-dose groups spent significantly more time in light compartment of LDT test than control group. Male mice of both dosing groups travelled longer distances in light compartment than the control group.</li> </ul>	(Sano u. a., 2016)
<b>Mosiplan (with the active ingredient acetamiprid)</b>				
A/J mice	3-week-old mice were housed at 22-24 °C, in 50-60% humidity, on a 12 h light/dark cycle. Dosed <i>via</i> drinking water with 0.594 mg/ml (0.66 ml Mosiplan SP/200 ml water) or 5.94 mg/ml (6.66 ml Mosiplan SP/200 ml water) for 180 days.	<u>Morphology:</u> body weight, testis weight (histological and biochemical analysis). <u>Serum samples from heart</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5.94 mg/ml significantly reduced body weight.</li> <li>• Abnormal seminiferous epithelium was observed in some seminiferous tubules after treatment.</li> <li>• Cell proliferation marker <i>Ki67</i> reduced in higher exposure group, <i>Top2a</i> affected by both treatment doses.</li> </ul>	(Terayama u. a., 2016)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
		<u>Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)</u> : of testis and pituitary gland. Examined <i>Ki67</i> , <i>Top2a</i> , <i>Lhr</i> , <i>Star</i> , <i>Cyp11a1</i> , <i>Cyp17a1</i> , and <i>Hsd17b1</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testosterone metabolism affected: higher dose of acetamiprid downregulated <i>Lhr</i>, <i>Star</i>, <i>Cyp11a1</i>, and <i>Hsd17b1</i>.</li> </ul>	
<b>Acetamiprid, clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam</b>				
Wildtype zebrafish	Reared at 28 °C with a 12 h light/dark cycle. Exposure was conducted for 24 h with 7 dpf old larvae, in 48-well plate with 1 larva per well in 1 ml medium. Vibrational startle response assay (VSRA) was conducted at 8dpf, with tapping intensity at 8, and 50 vibrational sequences. Exposure concentrations: Acetamiprid (40 and 400 µg/l), clothianidin (3 and 30 µg/l), dinotefuran (0.13 and 1.3 µg/l), and thiamethoxam (0.19 and 1.9 µg/l), environmentally relevant (ERC) and 'worst case scenario' (WSC, 10-fold of ERC), respectively.	<u>Behaviour</u> : Habituation and startle response to stimuli.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetamiprid: At ERC habituation was significantly reduced. At WSC the startle response was significantly increased, and habitation significantly reduced.</li> <li>• Clothianidin: At WSC the startle response was significantly increased</li> <li>• Dinotefuran: At ERC and WSC habituation was significantly reduced.</li> </ul>	(Faria u. a., 2020)
<b>Acetamiprid, clothianidin, thiacloprid, and thiamethoxam</b>				
ICR (CD-1 IGS) mice and New Zealand White rabbits	<u>In vitro</u> :- <u>Mice</u> : Adult 5-6-week-old female mice were mated and sacrificed to isolate the embryos at 2-cell stage. <u>Rabbits</u> : Adult female rabbits were mated, and the subsequent embryos	<u>Development</u>	<u>Mouse</u> : <ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µM affected embryonic development <i>In vitro</i>-, reducing number of embryos reaching blastocyst stage: thiacloprid &gt; clothianidin &gt; acetamiprid &gt; thiamethoxam.</li> <li>• 10 µM thiamethoxam also affected development.</li> </ul>	(Babeřová u. a., 2017)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
	<p>were flushed from the oviducts 20 h <i>post-coitum</i>. All embryos were exposed to 0, 0.1, 1, 10 and 100 µM of the neonicotinoids for 72 h.</p> <p><i>In vivo</i>-:</p> <p><u>Mice</u>: 5-6-week-old females were mated and fed with 0.3 or 3 mg/kg bodyweight thiacloprid <i>via</i> feed and syringe. 80 h after dosing, females were sacrificed and embryos isolated.</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i>-exposure decreased the cell number in blastocysts at both concentrations.</li> </ul> <p><u>Rabbit</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µM thiacloprid <i>In vitro</i>-decreased the cell numbers in blastocysts</li> </ul>	
<b>Clothianidin</b>				
ICR mice	<p>Housed at 23 °C, in 50% humidity on a 14/10 h light/dark cycle. Female mice on GD 1 were administered 65 mg/kg/day clothianidin <i>via</i> oral gavage either in a single-dose administration or daily dosing for 4 or 9 days. Single dose group was divided into 4 groups, collecting blood from dams and foetuses at 1, 3, and 6 h after administration on GD 18, after which the animals were sacrificed. The daily dose group received clothianidin once a day from GD 10 and 15 to 18 and samples were taken 6 h after dosing.</p>	<u>Blood analysis</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clothianidin and 5 metabolites found in dam and foetus blood samples.</li> <li>• Concentrations of clothianidin were significantly higher in animals sacrificed 1 h after administration, than in the 3 and 6 h animals. Concentrations of metabolites increased with increasing time after administration.</li> <li>• Positive correlation between blood levels of maternal clothianidin and that of the offspring (85% that of the dams), with similar findings for metabolites.</li> </ul>	(Ohno u. a., 2020)
Crj: CD1 mice	<p>4-week-old mice were housed at 25 °C, 50% humidity with a 12 h light/dark cycle. Clothianidin was administered <i>via</i> diet (0.003, 0.006,</p>	<p><u>Morphology</u>: size, mortality, weight, sex ratio.</p> <p><u>Behaviour</u>: Surface righting, negative geotaxis,</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• F0 males exhibited increased exploratory behaviour, average time of movement, number of rearing, and rearing time at 8 weeks of age in concentration-dependent manner.</li> </ul>	(Tanaka, 2012)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
	and 0.012%). F0 generation was examined on days 0, 2, 4, 7, 21, 28, and 30 during pre-conception. At 9-weeks, mating was conducted, dams were weighed weekly during gestation and lactation. F1 was examined 0, 4, 7, 14, and 21 PNDs, as well as 4- and 11-weeks post-weaning. Weaning was done at 4 weeks of age; one male and one female were randomly selected for continued treatment of each litter.	cliff avoidance, swimming behaviour, olfactory orientation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• F1 male average body weight increased significantly in low-dose group at postnatal day 7. Mid-dose group male body weight increased significantly at PND 4 and 7.</li> <li>• F1 female body weight was increased in low and mid-dose groups at PND 4 and 7.</li> <li>• The development of swimming head angles was significantly delayed in mid-dose male offspring at PND 7, and time taken for olfactory orientation at PND14 accelerated in mid-dose male offspring.</li> <li>• Female offspring surface righting at PND 4 in the low-dose group, and swimming head angle development in low- and mid-dose groups at PND 7 was accelerated. Negative geotaxis was affected in a concentration dependent manner and olfactory orientation was delayed in the mid-dose group. The number of rearing at 3 weeks of age was increased significantly.</li> <li>• Male exploratory behaviour at 8 weeks increased significantly.</li> <li>• At 10-weeks, males showed horizontal inactivity in the low-dose group whilst females were less active in average speed and rearing time for the mid-dosed group.</li> </ul>	
C57BL/6N mice	Male mice were housed in 23 °C and a 12 h light/dark cycle. Clothianidin was orally administered at 9-10 weeks of age (0, 5, or 50 mg/kg body weight). The elevated plus-maze test was conducted 1 h after administration. 2 h later, the neuroactivity was analysed.	<u>Behaviour:</u> Elevated plus-maze test, and vocalization. <u>Neuroactivity analysis</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 mg/kg dosed mice significantly affected total distance moved in the maze, whilst 50 mg/kg also reduced the number of entries into the open arms.</li> <li>• 50 mg/kg dosed mice spontaneously emitted vocalization in the maze when placed in open arms.</li> <li>• Only the medial blade of the dentate gyrus and paraventricular thalamic nucleus showed increases in the c-fos immunoreactive nucleus per area in 50 mg/kg dosed mice.</li> </ul>	(Hirano u. a., 2018)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
Albino Wistar rats	New-born male pups were dosed with 2, 8, or 24 mg/kg bodyweight <i>via</i> gavage from PND 7 until 97. Additionally, 8-9-week-old male rats were dosed with 2, 8, or 24 mg/kg bodyweight <i>via</i> gavage for 3 months.	<b>Behaviour:</b> Morris maze, probe trials. <b>Gene expression:</b> hippocampus expression of <i>grin1</i> , <i>m1</i> , <i>syp</i> , and <i>gap-43</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>The escape latency of adult mice on days 1 and 3 was affected by the exposure.</li> <li>Infant mice spent significantly less time in the target quadrant of the probe trial with increasing dosing.</li> </ul>	(Özdemir u. a., 2014)
<b>Dinotefuran</b>				
C75BL/6NrSlc mice	Male mice were dosed with 0, 100, 500, or 2500 mg/kg/day from 3 to 8 weeks of age <i>via</i> drinking water. Behavioural assays were conducted after the 6 weeks of exposure. Sacrifices were performed the following day.	<b>Behaviour:</b> Open field test and Y-maze test. <b>Brain samples:</b> weight, immunoreactivity to tyrosine hydroxylase (TH) in substantia nigra, and dopamine (DA) receptor D1 and D2 in striatum.	<ul style="list-style-type: none"> <li>TH immunoreactivity enhanced in the exposure groups.</li> </ul>	(Yoneda u. a., 2018)
C75BL/6NrSlc mice	3-week-old male mice were dosed with 0, 100, 500, and 2500 mg/kg/day dinotefuran for 5 weeks. Body weight was measured twice a week. On the final dosing day, the behavioural assays were performed, and sacrifices were performed the following day.	<b>Morphology:</b> Body weight. <b>Behaviour:</b> Tail suspension test and forced swim test.	<ul style="list-style-type: none"> <li>In the tail suspension test, 500 mg/kg/day dosed animals were less immobile than control animals.</li> </ul>	(Takada u. a., 2018)
<b>Dinotefuran &amp; imidacloprid</b>				
Chinese rare minnow	Reared at 25 °C, on a 16/8 h light/dark cycle. 2-month-old fish were exposed to 0.1, 0.5 or 2.0 mg/l compound for 60 days, being fed daily. The animals were sacrificed, and livers collected for oxidative stress assessment and the quantitative (q)RT-PCR.	<b>Oxidative stress:</b> liver GR, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). <b>qRT-PCR:</b> <i>CU7Zn-sod</i> , <i>Mn-Sod</i> , <i>cat</i> , <i>gpx1</i> , <i>glcl</i> .	<b>Dinotefuran:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>0.1 mg/l significantly reduced <i>Cu/zn-sod</i> and <i>gstm</i> expression, 0.5 mg/l reduced <i>cat</i>, <i>cyp1a</i>, and <i>gstp1</i>.</li> <li>2 mg/l significantly reduced <i>Mn-sod</i> expression.</li> <li>SOD and GR activity were significantly increased.</li> <li>CAT and MDA activity were significantly reduced.</li> </ul> <b>Imidacloprid:</b>	(Tian u. a., 2020)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
		<i>cyp1a</i> , <i>gstm</i> , <i>gtp1</i> , <i>ugt1a</i> , and $\beta$ - <i>actin</i> . <u>Comet assay.</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.5 mg/l significantly reduced <i>gstm</i> expression, 2 mg/l reduced <i>Cu/Zn-sod</i>, <i>gpx-1</i>, <i>cyp1a</i>, and <i>gstm</i>.</li> <li>• SOD and GR activity were significantly increased.</li> <li>• MDA activity was significantly decreased.</li> </ul>	
<b>Imidacloprid</b>				
Wildtype (AB) zebrafish	Reared at 26 °C with a 14/10 h light/dark cycle. Conducted the FET-Test (OECD TG 236) until 96 hpf, with medium renewal every 24 h.	<u>Morphology:</u> Mortality, LC, developmental alterations.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 48 hpf LC<sub>50</sub>: 186.9 mg/l</li> <li>• 96 hpf LC<sub>50</sub>: 143.7 mg/l</li> </ul>	(Yanhua Wang u. a., 2017)
Wildtype zebrafish and Japanese medaka	Imidacloprid was tested in a range of 0.2-200 µg/l. <u>Zebrafish:</u> Reared at 28 °C, 14/10 h light/dark cycle. Eggs were collected and exposure ended at 5 dpf. Swimming behaviour was assessed at 5 dpf. <u>Medaka:</u> Reared at 26 °C, 14:10 h light/dark cycle and exposure started at 13 hpf, ending at 14 dpf. Swimming behaviour was assessed at 14 dpf.	<u>Morphology:</u> Survival and development, histology. <u>Behaviour:</u> Swimming behaviour. <u>Biotransformation</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chorion was barrier to exposure for both species.</li> <li>• At the end of the exposures, about 15% of imidacloprid were biotransformed by the embryos.</li> </ul> <u>Zebrafish:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Marked thickening of muscle fibres in 2000 µg/l treatment group.</li> </ul> <u>Medaka:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Transiently affected hatching at 7 and 8 dpf.</li> <li>• Malformations included lordosis/scoliosis, haemorrhaging and jaw/skill deformation in a concentration dependent manner &gt;0.2 µg; and bone and yolk oedema, and tail deformities &gt;20 µg/l.</li> <li>• Moderate disorganisation of retinal pigment epithelium &gt;0.2 µg/l.</li> <li>• &gt;0.2 µg/l altered myomeric structure, as well as affecting total body length.</li> </ul>	(Vignet u. a., 2019)
Leghorn chicken	<u>Method 1:</u> Chicks at Hamburger-Hamilton (HH) stage 0 were incubated with 500 µM imidacloprid at 38 °C and 70% humidity	<u>Morphology:</u> Mortality, growth, weight, and somite development.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mortality increased to 50% by 14 days of incubation. Growth was significantly increased with treatment, but weight and somite development were reduced.</li> </ul>	(Gao u. a., 2016)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
	<p><u>Method 2:</u> 500 µM imidacloprid was applied to one side of gastrula-stage embryos.</p> <p><u>Method 3:</u> HH4 embryos were exposed to 500 µM imidacloprid through injection into windowed egg <i>In vivo</i>-and incubated for another 4.5 or 14 days.</p> <p><i>In situ</i> hybridisation, immunofluorescent staining, RT-PCR and western blots were performed.</p>	<p><u>Heart development:</u> morphology, and cardiomyocyte differentiation.</p> <p><u>Biochemistry:</u> <i>In-situ</i> for <i>vhmc</i>, <i>fata5</i>, <i>bmp2</i>, and <i>nkx2.5</i>. Immunofluorescent staining with MF20, E-cadherin, and Laminin antibodies. RT-PCR for <i>gata4</i>, <i>tbx5</i>, <i>vergr2</i>, <i>bmp3</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ventricular wall and trabecular muscle thickness were reduced with treatment.</li> <li>• On day 14, the heart size and weight were reduced, with whole embryo weight showing a similar tendency.</li> <li>• Right ventricular wall was thicker, with no effect on left ventricular wall or interventricular septum.</li> <li>• Some atypical C-looping was observed in HH10 chicks.</li> <li>• <i>Gata5</i> and <i>nkx2.5</i> expression was downregulated on imidacloprid-treated side of embryos exposed <i>via</i> method 2.</li> <li>• RT-PCR showed increased <i>Wnt3a</i>, and reduced <i>gata4</i>, <i>tbx5</i>, <i>vergr2</i>, and <i>bmp4</i> expression.</li> <li>• Western blot showed that GATA4, GATA6, and TBX5 were inhibited.</li> <li>• Expression of E-Cadherin in exposed embryos extended to epiblast, mesoderm, and hypoblast, whilst RT-PCR showed reduced N-cadherin and increased E-Cadherin expression.</li> <li>• Imidacloprid also inhibited migration of cardiac progenitor cells, as well as suppressing migration, polarisation, and protrusion formation of cardiac cells <i>In vitro</i>-.</li> </ul>	
CD-1 mice	<p>7–10-week-old mice were housed at 22 °C on a 12 h light/dark cycle. On GD3-6 osmotic mini-pumps were implanted, dispensing 0.5 mg/kg/day imidacloprid. Offspring was housed with respective female until weaning on PND 21. The pups were then sex-matched and housed undisturbed until PND 42. On PND 43-47, the open field</p>	<p><u>Behaviour:</u> Open field test, elevated plus maze, forced swim test, tube test, resident intruder test.</p> <p><u>Biochemistry:</u> Serum and tissue concentrations</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Number of pups from treated mice was lower than control mice.</li> <li>• Males were markedly lighter.</li> <li>• Triglyceride serum concentrations was significantly reduced.</li> <li>• The distance travelled in the open field test was significantly increased in dosed mice.</li> <li>• In the forced swim test, imidacloprid dosing significantly reduced time spent immobile in both sexes.</li> </ul>	(Burke u. a., 2018)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
	test was conducted. PND 47-54, the elevated plus maze was conducted. On PND 61-67, the forced swim test was conducted. The tube test was conducted on PND 54-64. On PND 66-72, the resident intruder test was conducted.		<ul style="list-style-type: none"> <li>• In the tube test, dosing significantly increased the winning percentage in both sexes.</li> <li>• Dosing also significantly reduced the attacks by residents count, duration, and fight time, compared to the control individuals, in the resident intruder test.</li> <li>• Liver and brain samples in maternal mice and pups was elevated, with the maternal concentration being higher.</li> </ul>	
Albino Wistar rats	New-born and 9-week-old male rats were treated with 0.5, 2, and 8 mg/kg body weight <i>via</i> gavage daily for 3 months. Buoyancy was tested at PND 97 (new-borns) or at 3 months of age, when they were sacrificed.	<u>Learning:</u> Morris maze, and probe trials.	<u>Infants:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 and 8 mg/kg doses increased latency in the Morris maze on days 3-5 of testing, and 8 mg/kg affected probe trials.</li> </ul> <u>Adults:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8 mg/kg made escape latencies longer on days 4 and 5 of the Morris maze, and 8 mg/kg affected probe trials.</li> </ul>	(Kara u. a., 2015)
Sprague-Dawley [Sas:CD(SD)BD] rats	Single dosing of 0, 42, 150 or 310 mg/kg body weight <i>via</i> gavage	<u>Morphology:</u> Mortality, development. <u>Serum analysis.</u> <u>Behaviour:</u> Functional observational battery	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 14 rats treated with 310 mg/kg body weight died.</li> <li>• Dose-related increased in incident and severity of effects was observed &gt;150 mg/kg, such as tremors, nasal staining, uncoordinated gait, decreased activity, increased reactivity, urine staining, and lowered body temperature.</li> <li>• Signs of toxicity observed on day 0 and resolved within 5 days.</li> <li>• A dose-related decrease in motor and locomotor activity was observed &gt;42 mg/kg for females and &gt;150 mg/kg for males.</li> <li>• At 150 mg/kg, serum triglyceride concentrations were decreased, and survivors of highest dose had decreased potassium and cholesterol concentrations (females) and decreased alanine aminotransferase activity (both sexes).</li> </ul>	(Sheets, 1994)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
Wildtype (AB) zebrafish	Reared at 26 °C, 14/10 h light/dark cycle. Fertilised eggs (2 hpf), larvae (72 hpf), juveniles (1 month old), and adults (3 months old) were utilized for multiple life-stage assays. For biochemical analysis, embryos were exposed until 96 hpf.	<u>Morphology:</u> Mortality, LC, development. <u>Biochemical and molecular tests:</u> SOD, CAT, glutathione-S-transferase (GST), carboxylesterase (CarE), Cyp450, Caspase3. Caspase 9, vitellogenin (VTG), triiodothyronine (T3), and thyroxine (T4). <u>Quantitative (q) PCR:</u> <i>Caspase3, Caspase9, Mn-sod, Cu/Zn-sod, cat, gpx, bcl-2, ucp-2, cas3, cas9, bax, Apaf.1, p53, CYCL-CIC, CC-chem, IL-1<math>\beta</math>, IL-8, TR<math>\alpha</math>, TR<math>\beta</math>, Dio1, Dio2, and tsh.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embryo LC<sub>50</sub>:121.6 mg/l</li> <li>• Larval LC<sub>50</sub>:128.9 mg/l</li> <li>• Juvenile LC<sub>50</sub>:1.13 26.39 mg/l</li> <li>• Adult LC<sub>50</sub>:76.08 mg/l</li> <li>• Reduced CarE and CAT activity, increased Cyp450, Caspase3 and Caspase9 activity.</li> <li>• Decreased relative <i>Mn-sod, Gpx, cas3, cas9, CXCL-CIC, CC-chem, IL-1<math>\beta</math>, IL-8, Dio1, Dio2,</i> and <i>tsh</i> mRNA levels, increased <i>Cu/Zn-sod, bcl-2, ucp-2, bax, p53,</i> and <i>TR<math>\beta</math></i> mRNA levels</li> </ul>	(Wu u. a., 2018)
<b>Imidacloprid &amp; nicotine</b>				
Wildtype (AB and 5D) zebrafish	Reared at 28.5 °C on 14/10 h light/dark cycle. 2 hpf eggs were placed in 50 ml aqueous solution with 35 individuals per dish for 5 days with daily medium renewal. Solutions were either control, nicotine or imidacloprid (45 or 60 $\mu$ M). At 5 dpf, embryos were transferred to un-dosed aquarium water. Those destined for larval assessment were placed in 96-well plate with un-dosed water for behavioural exami-	<u>Behaviour:</u> Larvae: swimming activity in response to environmental stimuli Adolescents: Startle response and habituation, novel tank exploration, and shoaling behaviour. Adults: Startle response and habituation, novel tank exploration, shoaling behaviour, and predator avoidance.	<u>Larval activity:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt;45 <math>\mu</math>M nicotine and imidacloprid significantly reduced activity during dark phase</li> </ul> <u>Adolescent neurobehaviour:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt;45 <math>\mu</math>M imidacloprid and 45 <math>\mu</math>M nicotine exposure induced hyperactivity in the startle response assay</li> <li>• Individuals treated with imidacloprid spent more time during minutes 4 and 5 of the novel tank assay near the tank floor.</li> <li>• 45 <math>\mu</math>M nicotine exposed fish swam significantly further than control individuals in the shoaling assay.</li> </ul>	(Crosby u. a., 2015)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
	nation 24 h later. Embryos for adolescent and adult assessment were reared in un-dosed water in aquaria.		<u>Adult neurobehaviour:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;45 <math>\mu\text{M}</math> nicotine and 60 <math>\mu\text{M}</math> imidacloprid induced fish to remain significantly closer to tank floor in novel tank assay.</li> </ul>	
Wildtype zebrafish	Rearing in 28 °C on a 12 h light/dark cycle. Embryos were treated with 50 $\mu\text{M}$ nicotine or 5,25, or 50 $\mu\text{M}$ imidacloprid for 24 h from 7- or 8 dpf and experiments conducted in 48-well plates. Toxicity was examined at 8 dpf. The startle response was examined using high intensity tapping followed by vibrations of the plate.	<u>Morphology:</u> mortality, developmental changes, impaired swimming. <u>Behaviour:</u> VSRA, habituation.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nicotine exposed larvae moved significantly more during the VSRA</li> <li>&gt;25 <math>\mu\text{M}</math> imidacloprid significantly reduced the distance moved in a concentration dependent manner.</li> </ul>	(Faria u. a., 2019a)
<b>Nicotine</b>				
Wildtype zebrafish	Rearing in 0, 10, 20 or 40 $\mu\text{M}$ nicotine in 250 ml beakers 28 °C, 14/10 h light/dark cycle (40-50 embryos per group). Daily renewal of 50-75% of the medium. Feeding with paramecia from 72 hpf. Sacrificed at 10 dpf.	<u>Morphology:</u> notochord length, dry weight, hatching success, morphological alterations, pigmentation. <u>Behaviour:</u> startle response swimming (ranked compared to control).	<ul style="list-style-type: none"> <li>Exposure reduced overall egg survival.</li> <li>Notochord length, dry weight, and eye diameter reduced by &gt;20 <math>\mu\text{M}</math>.</li> <li>Hatching delayed with increasing concentration.</li> <li>40 <math>\mu\text{M}</math>: short or bend body axis and altered pigmentation.</li> <li>&gt;20 <math>\mu\text{M}</math> reduced startle response from 5 dpf onwards.</li> </ul>	(Parker und Connaughton, 2007)
Wildtype (AB) zebrafish	Embryos were reared in exposure medium at 28 °C, 14/10 h light/dark cycle from 24 to 120 hpf. Behavioural analyses were conducted at 5 dpf without prior medium renewal.	<u>Morphology:</u> Mortality, LC, development. <u>Behaviour:</u> visual motor response to light changes in the swimming assay	<ul style="list-style-type: none"> <li>LC<sub>50</sub>: at 24 hpf 0.47 mMol/l, at 48 hpf 45 mMol/l</li> <li>10-40 mg/l: monotonic suppression of distance moved during the light and dark phases basal swimming phase compared to the control</li> </ul>	(Ali u. a., 2012)
Wildtype (AB) and transgenic (TG)	Reared at 28.5 °C under 14/10 h light/dark cycle, with approx. 50 embryos per 100-mm petri dish.	<u>Embryotoxicity (wildtype):</u> hatching rate, mortality, bent spine and	<ul style="list-style-type: none"> <li>1% embryotoxicity in 5 <math>\mu\text{M}</math>, 44% in 40 <math>\mu\text{M}</math> treatment group.</li> </ul>	(Yoo u. a., 2018)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
( <i>brn3c:egfp</i> and <i>cmlc2:egfp</i> ) zebrafish	Embryotoxicity of 0, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{M}$ nicotine assessed by 72 hpf (10 larvae per well, 80 larvae per treatment).	tail, stunted growth, malformed yolk sacs, and oedema. <u>Embryotoxicity (transgenic)</u> : heart malformation, heart rate <u>Hair cell toxicity at 120 hpf</u> : neuromast analysis, hair cell apoptosis and mitochondrial damage within hair cell <u>Intracellular reactive oxygen species (ROS)</u> <u>Ultrastructural changes</u> : Scanning electron microscopy	<ul style="list-style-type: none"> <li>No heart malformations observed, but heart rate reduced in concentration dependent manner.</li> <li>In <i>brn3c:egfp</i>: decreased average number of hair cells in neuromasts, and at 120 hpf, individuals exposed to 40 <math>\mu\text{M}</math> were almost all dead.</li> <li>In AB: nicotine treatment increased hair cell damage</li> <li>ROS induced by 40 <math>\mu\text{M}</math></li> <li>Kinocilia of hair cells destroyed after 40 <math>\mu\text{M}</math> exposure, and fewer stereocilia bundles observed after 5 <math>\mu\text{M}</math> treatment.</li> </ul>	
Homozygous wildtype and <i>islet-1 TG</i> zebrafish	Rearing in untreated water with daily medium renewal. At 19-21 hpf, embryos were dechorionated manually. At 22 hpf, pigmentation was inhibited with 1-phenyl-2-thiourea (PTU) and 0-22 $\mu\text{M}$ nicotine for exposure groups. Where nicotinic receptor antagonists (MLA and DH $\beta$ E at 100 nM, 2 and 20 $\mu\text{M}$ ) were used: applied 2 h before nicotine exposure.	<u>Morphology (at &lt;66 hpf)</u> : body length. <u>Behaviour</u> : escape and swimming on tactile stimulus of tail bud. <u>Nervous system development</u> : immunocytochemistry, GFP visualisation and motoneuron innervation assessment.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduced overall growth from 42 hpf onwards</li> <li>33 <math>\mu\text{M}</math> induced muscular response but lack of swimming at 42 hpf, remained paralysed until 120 hpf.</li> <li>Partial recovery when exposed between 22 and 66 hpf and allowed to recover by 120 and 168 hpf.</li> <li>&gt;66 hpf only few GFP-expressing motoneurons in spinal cord, with increased expression in rescued embryos at 120 hpf</li> <li>15 and 33 <math>\mu\text{M}</math> reduced% ventral myotomes with GFP-expressing axons</li> <li>Continued expression of zn5 indicated delay in normal downregulation program.</li> <li>33 <math>\mu\text{M}</math> reduced% of innervated dorsal segments at 66 hpf, with recovery potential.</li> </ul>	(Svoboda u. a., 2002)
Wildtype (TL, AB and WIK) and TG ( <i>isll:gfp</i> ,	Reared at 28 $^{\circ}\text{C}$ until 13 hpf, then at 25 $^{\circ}\text{C}$ . Some embryos were dechorionated <i>via</i> enzymatic digestion	<u>Behaviour</u> : motor output (spinal musculature bend), and percentage of	<ul style="list-style-type: none"> <li>33 <math>\mu\text{M}</math> exposure of un-dechorionated embryos induced paralysis by 66 hpf, with brief period of increased motor output initially.</li> </ul>	(Thomas u. a., 2009)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
<i>fli1:gfp</i> , and <i>nbt:mapt-gfp</i> zebrafish	and from 22 hpf onwards exposed to 1-30 $\mu$ M nicotine, with daily renewal. For coiling response, control and dosed individuals were examined, as well as all groups after acute exposure to 5-30 $\mu$ M for 3 minutes, and after a recovery phase. Some were decapitated to determine tail movement alone.	full movements (doublets) <u>Immunohistochemistry</u> <u>[<sup>3</sup>H]-nicotine uptake:</u> measuring –(-)-[N-methyl- <sup>3</sup> H] nicotine activity <i>via</i> liquid scintillation counting <u>Influx and efflux:</u> with radioisotopes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5-30 <math>\mu</math>M produced increased muscle bends in dechorionated embryos at 27-28 hpf, as well as reducing the percentage of doublets to almost zero, which recovered during washing.</li> <li>• 30 <math>\mu</math>M caused 4-fold increase in musculature bend in dechorionated embryos at 22, 24, 25 and 26 hpf, but failed to induce the same response to 30 <math>\mu</math>M after a 2 h wash period, desensitising the receptors.</li> <li>• Tails from decapitated embryos exhibited increased musculature bends when placed in 5-30 <math>\mu</math>M nicotine.</li> <li>• Exposure to high, followed by low concentration nicotine did not induce increased musculature bends after washing.</li> <li>• Steady state of exposure for nicotine accumulation in embryos reached after 10 minutes of exposure, increasing with increasing medium concentration, but always being less than the waterborne concentration.</li> </ul>	
Wildtype (EkkWill) and TG ( <i>isl2b:gfp</i> ) zebrafish	Reared at 28 °C with 14/10h light/dark cycle, exposed to 3-300 $\mu$ M nicotine. For some assays, embryos were reared in 0.002-0.0045% PTU containing medium 24 hpf. Embryos were collected and placed in 100-mm petri dished for microinjection with morpholino antisense oligonucleotides (MOs). RT-PCR was performed at 24 and 48 hpf.	<u>Morphology:</u> Mortality, development. <u>Behaviour:</u> spinal musculature bends between 20 and 28 hpf, some were dechorionated after nicotine exposure at 22 or 24 hpf. Response to tactile stimuli of trunk performed at 31 hpf. <u>In situ hybridisation:</u> of PTU treated embryos for $\alpha$ 2A nAChR probes MOs targeted to the predicted translation site of	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math>2A nAChR mRNA present in olfactory neurons and spinal cord from 19 hpf onwards (probably Rohon beard neurons).</li> <li>• Translated protein also found present in olfactory epithelium, spinal cord, and muscle.</li> <li>• Injection of <math>\alpha</math>2A MO reduced <math>\alpha</math>2A protein expression significantly in olfactory epithelium and Rohon beard neurons, successfully blocking expression of nAChR <math>\alpha</math>2A subunit <i>In vivo</i>.</li> <li>• <math>\alpha</math>2A morphants showed reduced bend rates immediately after exposure to 60 <math>\mu</math>M nicotine.</li> <li>• Between 20 and 22 hpf, nicotine-induced swim-like behaviour was almost completely missing in <math>\alpha</math>2A morphants, but by 23 hpf a significantly reduced motor response was elicited.</li> </ul>	(Menelaou u. a., 2014)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
		nAChRs $\alpha 2$ subunit, the splice blocking of the exon2-intron2 boundary, and a standard control). <u>Immunohistochemistry:</u> zn8 (aka. zn5), znp1, F59, and zn12.	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>\alpha 2A</math> MO did not disrupt formation of muscle-specific nAChRs.</li> <li>Input elements (spinal neurons) produce nicotine-induced swim-like behaviour, without affecting output elements (motoneurons and muscles)</li> </ul>	
Homozygous wildtype (AB, WIK, and TL) and TG ( <i>isl1:gfp</i> ), and <i>sofa potato (sop)</i> zebrafish	Reared at 28 °C on 14/10 h light/dark cycle. Untreated until 22 hpf, then exposed to 15 or 30 $\mu$ M nicotine until 72 hpf.	<u>Behaviour:</u> 48 hpf tail touch response <u>Live imaging of <i>isl1</i> embryos</u> <u>Morphology:</u> via whole-mount immunohistochemistry (F59, F310, znp1, zn5, and anti- $\beta 2$ ), and histology	<ul style="list-style-type: none"> <li>Exposed embryos had shortened dorsal/ventral axis with disorganized atrophic muscles.</li> <li>Nicotine altered slow and fast muscles in wildtype and <i>isl1</i> embryos.</li> <li>In <i>isl1</i> embryos pathfinding problems of secondary motoneuron axons after exposure to 15-30 <math>\mu</math>M nicotine until 72 hpf was observed</li> </ul>	(Welsh u. a., 2009)
Zebrafish and African frogs	Reared at 28 °C. Zebrafish nAChR cDNA was cloned for subunits $\alpha 4$ , $\alpha 2$ , $\beta 2$ , $\alpha 7$ , $\alpha 3$ and $\beta 4$ . qPCR performed 1, 2, 3, 8 and 21 dpf. Mature female <i>Xenopus</i> ovaries were removed, and stage 5 oocytes were isolated and injected with subunit cRNA, followed by up to 10 days of recovery.	<u>Zebrafish nAChRs in <i>Xenopus</i> oocytes:</u> Expression, electrophysiology, and functional responses. <u>qPCR:</u> $\beta 1a$ , $\beta 1b$ , and <i>Elongation factor1- <math>\alpha</math></i> ( <i>Elf1- <math>\alpha</math></i> ).	<ul style="list-style-type: none"> <li>All tested receptors responded well to Ach concentration <math>&gt;3 \mu</math>M.</li> <li>Nicotine was partial agonist for all heteromeric receptor subtypes, being most potent for <math>\alpha 4\beta 2</math> and least potent for muscle-type receptors</li> <li>Nicotine was full agonist for <math>\alpha 7</math></li> </ul>	(Papke u. a., 2012)
Wildtype (AB) zebrafish and RUES2 human Embryonic Stem Cells (ESC)s	<i>In vivo-</i> : Continuous exposure of embryos to tobacco smoke (TS), aerosol (AE) extracts (generated from cigarettes and e-cigarettes, containing 1 e-cigarette cartridge or 22 cigarettes) or nicotine until 72 hpf, with daily renewal. 14/10 h light/dark cycle, at 27.5 °C	<i>In vivo-</i> : <u>Morphology at 72 hpf:</u> heart malformation, heart rate <u>Gene expression at 24 hpf</u> <i>In vitro-</i> :	<i>In vivo-</i> : <ul style="list-style-type: none"> <li>34 <math>\mu</math>M TS extract reduced survival at 24 hpf.</li> <li>34 <math>\mu</math>M TS and AE extracts reduced survival <math>&gt;48</math> hpf.</li> <li>13.7 <math>\mu</math>M TS extract induced decreased hatching and pigmentation.</li> <li>TS and AE extracts induced heart defects, but only TS extracts reduced the heart rate.</li> </ul>	(Palpant u. a., 2015)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
	<i>In vitro</i> :- 1.7, 3.4, 6.8 and 13.7 µM nicotine from extracts from differentiation onset, and renewed daily	Gene expression, flow cytometry, immunofluorescence, cell stress assay	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Only TS significantly affected gene expression (of <i>cmlc2</i>, <i>tnnt2</i>, <i>nkx2.5</i>, <i>mef2ca</i>, and <i>cx43</i>).</li> </ul> <i>In vitro</i> :- <ul style="list-style-type: none"> <li>• TS extract &gt;6.8 µM altered beats per minute and cardiomyocyte maturity, whilst 13.7 µM reduced cardiomyocyte yield and purity.</li> <li>• TS affected gene expression more significantly than EA extracts.</li> </ul>	
Virgin Sprague-Dawley rats	Pregnant females dosed with 0.05 mg/ml nicotine as source of drinking water. Dosed for the last 14, 6 or 4 days of pregnancy. For experiment 2, dosing continued post-delivery and both adult and foetal rats were sacrificed at 21 or 22 PND.	<u>Experiment 1</u> : foetal body weight was measured, and brain and liver lipid and nitrogen determination on pooled organs). <u>Experiment 2</u> : body weight.	<u>Experiment 1</u> : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Significant reduction in foetal body weight.</li> <li>• Brain weight was slightly increased, liver weight was not affected.</li> <li>• Significant differences between treated and control rats were found in liver lipid/tissue, lipid/nitrogen, and cholesterol/lipid ratios.</li> </ul> <u>Experiment 2</u> : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nicotine during weaning led to rougher fur and reduced foetal mean body weight.</li> </ul>	(Mosier und Armstrong, 1964)
Sprague-Dawley rats	Dosing of females <i>via</i> drinking water. High dose: 20 µg/ml until parturition, 10 µg/ml during weaning. Low dose: 20 µg/ml for 1 week, 40 µg/ml until parturition, 20 µg/ml during weaning. When dosed with highest concentration respectively, mating proceeded, and litters reduced to 8 pups. Litters from dosed females either remained with original mother or were switched with control litter 1 day after delivery. All pups weaned and on PND 20, 30 or 40, they were sacrificed.	<u>Plasma LH analysis</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prepubertal female and male offspring exposed to low dose of nicotine during lactation showed significant variation in LH levels from control</li> <li>• Female offspring of rats dosed during pregnancy or lactation showed significantly reduced body weight.</li> </ul>	(Meyer und Carr, 1987)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
Sprague-Dawley rats	Pregnant females on gestation day 1 to implant subcutaneous minipump with 1.5 mg/kg/day saline or nicotine, for 28 days. On PND 1, litter was examined and saline-and nicotine-exposed pups were cross-fostered to drug-free females. Maternal plasma levels of nicotine and cotinine (nicotine metabolite) were determined after birth. Behavioural assessment with pups conducted on PND 5, 9, and 14. Striatal levels of neurotransmitter were examined in 14-day old pups.	<u>Upon delivery:</u> Number, viability, sex ratio, birth weight and body length. <u>Behaviour:</u> Position reflex, surface righting and negative geotaxis <u>Biochemistry:</u> DA and its metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effective nicotine administration shown by nicotine and cotinine in maternal blood.</li> <li>• Number of pups of nicotine treated females was significantly reduced, as well as affecting pup body weight and length.</li> </ul>	(Fung und Lau, 1989)
Sheep and Sprague-Dawley rats	<u>Sheep:</u> Pregnant ewes with male foetuses were fitted with catheters in foetal and maternal femoral veins on GD 130. After acclimatization, 10 or 25 µg/kg nicotine was intravenously infused <i>via</i> the maternal vein in 5 minutes. <u>Rat:</u> From GD 3 to delivery, treated subcutaneously with either 0.3 ml saline solution or 1.5 mg/kg nicotine hydrogen tartrate twice daily. Pups were born naturally and allowed to wean. Male offspring were removed after weaning and examined at 4-5 months of age, assessing heart rate of control and exposure groups after acclimatisation and after injection of 2 mg/kg nicotine.	<u>Sheep:</u> Maternal and foetal heart rate and blood flow, Foetal blood analysis (pH, PO <sup>2</sup> , PCO <sub>2</sub> , lactic acid, haemocrit, Na <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> ). <u>Rat:</u> Electrocardiogram in 4-5-month-old male rat offspring	<u>Sheep:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Foetal PO<sub>2</sub> decreased and PCO<sub>2</sub> increased with ewe dosing</li> <li>• Intravenous infusion of 10 and 25 µg/kg into ewes induced significantly reduced heart rate within 15 minutes, followed by foetal heart rate increase.</li> <li>• Various types of foetal arrhythmia were noted only after maternal nicotine infusion.</li> </ul> <u>Rat:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Heart rate of nicotine exposed rats was significantly higher during immobilisation period</li> <li>• After nicotine injection, rats of un-dosed and dosed maternal rats showed decreased heart rate, with offspring of exposed rats showed less of a decrease.</li> <li>• Nicotine injection increased arrhythmia in exposed offspring more than in control offspring.</li> </ul>	(Feng u. a., 2010)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
S-strain mice	5-15 days post mating, 0.1% aqueous solution nicotine injection (either subcutaneous or intraperitoneally) 1, 2 or 3 times (on consecutive days). Most were sacrificed at term, whilst some were sacrificed mid-pregnancy	<u>At term and mid-pregnancy observations:</u> total litter, average litter, foetal death, congenital abnormalities	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosing induced foetal death and complete resorption at different time points of dosing (exposure at days 9, 10 and 11 most severely)</li> <li>• Most malformations were linked to the skeletal system, predominantly affecting the limbs, as well as spinal curvature and cleft palate</li> </ul>	(Nishimura und Nakai, 1958)
Swiss-Webster mice	Females were dosed with nicotine for 5 weeks (dose increases as follows: Day 1-7 - 20 µg/ml; from day 8 – 60 µg/ml. For one group: from day 21 – 100 µg/ml). Breeding was conducted after 2 weeks after final dosing. Pregnant females were injected with 1.3 mg/kg nicotine either once or twice daily, from GD 12 onwards. On GD 17, the mice were sacrificed 20 minutes after receiving the final dose.	<u>Morphology:</u> Foetus and placenta weighed separately <u>Biochemistry:</u> α-aminoisobutyric acid (AIB) and ACh levels.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nicotine reduced foetal weight in concentration dependent manner.</li> <li>• Dose related inhibition of intracellular concentration of AIB when dosed <i>via</i> water.</li> <li>• Nicotine injection 20 minutes prior to sacrificing induced similar intracellular AIB reduction, but not when injected 5-days prior to sacrifice.</li> </ul>	(Rowell und Clark, 1982)
CD-1 mice	30-35 days old male mice housed 6 per cage. Nicotine dissolved in 0.9% saline, injected intraperitoneally in doses of 0, 0.05, 0.4, or 0.8 mg/kg in 0.0075 ml/g 5, 15 or 25 minutes before assessment. Activity was assessed horizontal and vertical activity of two animals simultaneously	<u>Activity:</u> total distance moved, rest time, number of vertical/rearing movement, time response in open field activity, effect on striatal DA, Ach and carbohydrate metabolism.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5-15 minutes after administration, 0.8 mg/kg reduced activity.</li> <li>• 15-25 minutes after administration, 0.05 mg/kg increased activity by 28%, whilst 0.8 and 1.2 mg/kg reduced total distance by 56 and 77%, respectively. Total distance decrease between 1.2 and 0.8 mg/kg significantly different, too.</li> <li>• Open field behaviour affected by 0.8 mg/kg: depressant effect immediately set in, reached maximal effect 10 minutes after administration.</li> <li>• Vertical rearing originally reduced by nicotine exposure but increased by 40 minutes.</li> <li>• 0.8 mg/kg significantly increased DOPAC levels.</li> <li>• Glucose specific activity significantly reduced by 0.8 mg/kg in striatum, hippocampus, and cortex, as</li> </ul>	(Freeman u. a., 1987)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
<b>Thiacloprid</b>				
Wildtype (AB) zebrafish	Reared at 26 °C and a 12 h light/dark cycle. FET-Test (OECD TG 236) and fish acute toxicity (AFT) test (OECD TG 203) were conducted. Medium was renewed every 12 h. At 96 hpf, latched larvae were gathered and rinsed for biochemical and molecular analysis. Exposure concentrations were 438, 1750 and 7000 nM.	<u>Toxicity testing</u> <u>Biochemical and molecular assays:</u> MDA, total (T) GR, oxidised glutathione (GSSG), ROS, CAT, T-SOD, Cu/Zn-SOD, peroxidase (POD), caspase 3, caspase 9, GST, CarE, and CYP450.	<p>well as increasing regional concentrations of choline in those regions (whilst not affecting ACh concentration).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Embryo LC<sub>50</sub>:1.4 nM</li> <li>• Larval LC<sub>50</sub>:2.86 nM</li> <li>• Juvenile LC<sub>50</sub>:1.13 nM</li> <li>• Adult LC<sub>50</sub>:2.97 nM</li> <li>• Thiacloprid exposure further altered MDA, CAT, T-SOD, Cu/Zn-SOD, T-GSH, POD, Caspase3, ROS, CYP450, CarE, and GST levels at different concentrations in embryos.</li> <li>• Relative mRNA levels of <i>tsh</i>, <i>cyp19a</i>, <i>crh</i>, <i>Tnf</i>, <i>bax</i>, <i>p53</i>, and <i>cas8</i> were further affected in embryos.</li> </ul>	(Wang u. a., 2020)
Wildtype (WIK) zebrafish	Reared at 26 °C, with a 14/10 h light/dark cycle. Eggs were exposure to 1, 5, 10, 15, and 20 mg/l at 26, 28, 30 and 33.5 °C. After 90 minutes, fertilised eggs were transferred into fresh medium at those temperatures. At 26 and 28 °C the experiments were conducted until 96 hpf, the remaining experiments ended at 72 hpf, with observations made at 8, 12, 24, 48, 60, 72, 84, and 96 hpf.	<u>Morphology:</u> Mortality, heart rate, and development.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The average heartbeat per minute increased with increasing temperature, as well as showing a concentration dependent in- and then decrease, peaking at 10 mg/l.</li> </ul>	(Osterauer und Köhler, 2008)
<b>Thiamethoxam</b>				
Wildtype (AB) zebrafish	Reared at 28-5 °C, on a 14/10 h light/dark cycle. Fertilised eggs were treated with 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg/l, and morphologically examined at 3, 6, 10, 24, 72, and	<u>Morphology:</u> survival, hatching, surface tension <u>In situ hybridisation:</u> for <i>ntl</i> (10 hpf), <i>krox20</i> , and <i>shh</i> (13 hpf)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embryo surface tension was significantly reduced compared to DMSO control embryos (DMSO slightly reduced surface tension compared to control embryos).</li> </ul>	(Liu u. a., 2018)

Model organism	Methodology	Assessed end-point(s)	Significant finding(s)	Reference
	<p>96 hpf. Embryos exposed to 0.01 mg/l were examined for surface tension from 0.75 to 24 hpf. Whole-mount <i>in situ</i> hybridisation was conducted at 10 or 13 hpf. The behavioural analysis was conducted at 4 dpf, for 48 h.</p>	<p><u>Behaviour</u>: swimming assay.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activity in the swimming assay was overall reduced in a concentration dependent manner.</li> </ul>	