

**Entwicklung und Erprobung eines Teratogenitäts-Screening Testes
mit Embryonen des Zebrafischlings *Danio rerio***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von
Jean Bachmann

Gutachter: Prof. Dr. R. Nagel
Prof. Dr. G. Vollmer
Prof. Dr. Dr. H.-P. Gelbke

Dresden, im April 2002

Danksagung

Während der Erstellung dieser Arbeit habe ich vielfältige Unterstützung von verschiedenen Personen erfahren. Ich bedanke mich dafür bei allen Beteiligten sehr herzlich.

An erster Stelle sei Herr Prof. Dr. Nagel genannt, der es mir ermöglichte, die vorliegende Arbeit am Institut für Hydrobiologie durchzuführen. Er gab den Anstoß für die Arbeit, betreute und förderte sie, indem er unter anderem immer Zeit für wertvolle Anregungen und Diskussionen fand.

Die vorliegende Arbeit stellt einen Teil des von der BASF AG, Ludwigshafen geförderten Projektes „Teratogenitätsprüfung mit Fischembryonen“ dar. Herrn Prof. Dr. Dr. Gelbke und Herrn Dr. Dr. Jäckh ist es zu verdanken, daß dieses Projekt zustande gekommen ist. Sie unterstützen diese Arbeit, indem sie freundlicherweise verschiedene Testsubstanzen zur Verfügung stellten und wertvolle Anregungen und Hinweise gaben.

Weitere Testsubstanzen wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. Neubert (FU Berlin) und Herrn Prof. Dr. Nau (Tierärztliche Hochschule Hannover) bereitgestellt.

Allen Gutachtern gilt mein besonders herzlicher Dank dafür, daß sie bereit waren, in so kurzer Zeit die vorliegende Arbeit zu lesen und zu bewerten.

An dieser Stelle möchte ich auch allen Mitgliedern – und ehemaligen Mitglieder – der Arbeitsgruppe „Ökotoxikologie“ meinen Dank aussprechen. Von ihnen kamen vor allem fachliche Ratschläge, kritische Anmerkungen und Aufmunterungen. Auch die Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei. Besonders sei Sabine Richter geb. Maiwald für die Bereitstellung der Daten zu Aceton und Ethanol gedankt. Regine danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die es mir ermöglichten zu studieren und damit den Grundstein für diese Arbeit zu legen.

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden.....	3
2.1	Geräte und Materialien	3
2.2	Testsubstanzen	4
2.3	Testorganismus	9
2.3.1	Der Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)	9
2.3.2	Embryonalentwicklung.....	10
2.4	Testmethode.....	12
2.4.1	Hälterung der Elterntiere und Eigewinnung	12
2.4.2	Testvorbereitung.....	13
2.4.3	Exposition und Differenzierung	13
2.4.4	Testmedium.....	14
2.4.5	Konzentration und Aufnahme der Testsubstanzen.....	14
2.4.6	Einsatz von Lösungsvermittlern.....	15
2.4.7	Osmolarität der Testsubstanzen	15
2.4.8	Toxikologische Endpunkte	15
2.4.9	Testende.....	20
2.4.10	Qualitätskriterien.....	20
2.5	Datenauswertung und Statistik.....	21
2.6	Teratogenitätsindex TI.....	21
3	Ergebnisse und Diskussion	22
3.1	Aceton.....	23
3.2	Blei(II)-acetat-Trihydrat	28
3.3	Colcemid.....	30
3.4	Cycloheximid	34
3.5	Ethanol.....	40
3.6	Ethylacetat	45
3.7	α-D-Glucose.....	49
3.8	Glykoletherverbindungen	53
3.8.1	Diethylenglykoldimethylether und Metabolite	53
3.8.1.1	Diethylenglykoldimethylether	53
3.8.1.2	2-Methoxyethanol	57
3.8.1.3	Methoxyessigsäure	62
3.8.1.4	Methoxyessigsäureisopropylester	65
3.8.1.5	Diethylenglykoldimethylether und Metabolite – zusammenfassende Betrachtung	67
3.8.2	Butyldiglykol	71
3.8.3	Diethylenglykol.....	75
3.8.4	1-Methoxy-2-propanol.....	79
3.9	2,5-Hexandion.....	84
3.10	Hydroxyharnstoff	87

3.11	Isoniazid.....	92
3.12	Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	96
3.13	D-Mannitol.....	99
3.14	3-Methyl-1-butanol	101
3.15	Methylformamide und Metabolite	106
3.15.1	N,N-Dimethylformamid	106
3.15.2	N-Methylformamid.....	110
3.15.3	Methylcarbamoylcystein.....	114
3.15.4	Methylcarbamoylglutathion.....	120
3.15.5	Methylformamide und Metabolite – zusammenfassende Betrachtung	124
3.16	Methylquecksilberchlorid	127
3.17	Penicillin G-Natriumsalz	133
3.18	2-Propanol.....	135
3.19	Retinoide.....	141
3.19.1	all-trans-Retinol.....	141
3.19.2	Vitamin A-Säure	145
3.19.3	Retinoide – zusammenfassende Betrachtung.....	148
3.20	Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat	149
3.21	Salicylate.....	153
3.21.1	Acetylsalicylsäure	153
3.21.2	Salicylsäure	156
3.21.3	Salicylate – zusammenfassende Betrachtung	160
3.22	Thalidomid und EM 12	160
3.22.1	Thalidomid	160
3.22.2	EM 12	161
3.22.3	Weitere Untersuchungen mit EM 12.....	162
3.22.3.1	Mechanisches Entchorionieren der Embryonen	162
3.22.3.2	Pulsuntersuchungen.....	163
3.23	Valpronsäure und Strukturanaloga.....	167
3.23.1	Valpronsäure	167
3.23.2	Valpromid	170
3.23.3	Isobutyl-ethyl-Valpronsäure	176
3.23.4	Valpronsäure und Strukturanaloga – zusammenfassende Betrachtung.....	179
3.24	Erweiterung der Datenbasis nicht säugerneratogener Substanzen.....	182
3.24.1	Benzoessäure	182
3.24.2	Ethylendiamin	183
3.24.3	Harnstoff	183
3.24.4	1-Octanol	184
4	Abschließende Betrachtung	185
4.1	Methodenkritik	185
4.1.1	Dampfdruck	185
4.1.2	Wasserlöslichkeit	185
4.2	Vergleich der Substanzen	186

4.2.1	Vergleich der berechneten Wirkkonzentrationen.....	186
4.2.2	Quantifizieren des teratogenen Potentials.....	190
5	Zusammenfassung	194
6	Abkürzungsverzeichnis.....	196
7	Abbildungsverzeichnis.....	197
8	Tabellenverzeichnis	199
9	Literatur	203
10	Anhang A.....	I
11	Anhang B	X

1 Einleitung

Obwohl fetale Mißbildungen seit langem bekannt sind, wird eine intensive Prüfung von Arzneimitteln und anderen Substanzen erst seit den 1960er Jahren durchgeführt. Die „Thalidomid-Katastrophe“ hat durch Arzneimittel verursachte teratogene¹ Effekte ins Bewußtsein der Öffentlichkeit und der Wissenschaft geführt. Untersuchungen zur Reproduktionstoxikologie gehören seit dieser Zeit zur Routine bei der Zulassung von Arzneimitteln und Pestiziden (Marquardt & Schäfer, 1994).

Bevorzugt werden Ratte und Kaninchen als Versuchstiere verwendet. Sie gelten als sensibel, um embryotoxische Effekte aufzudecken. Embryotoxizität wird oft als Oberbegriff verwendet und umfaßt durch Noxen verursachte embryonale, teratogene und wachstumsretardierende Effekte (Lohs et al., 1999). Neben der Dosis ist für die Prüfung im Tierversuch der Zeitpunkt der Applikation der Testsubstanz von ausschlaggebender Bedeutung, da spezielle Organschäden oft nur während eines bestimmten Zeitraumes der Organentwicklung erfolgen.

Dem Tierschutzbericht von 2001 ist zu entnehmen, daß im Jahr 1999 insgesamt etwa 1,6 Millionen Wirbeltiere zu Versuchszwecken benötigt wurden. Davon entfielen 77 % auf Mäuse, Ratten und Kaninchen (BMVEL, 2001). Nicht zuletzt aus ethischen Gründen sollte die Etablierung von Alternativmethoden zu Tierversuchen einen hohen Stellenwert in der wissenschaftlichen Forschung einnehmen.

Zur Untersuchung vielfältiger Stoffen, wie z.B. neu entwickelter Arzneimittel und Chemikalien, eignen sich Screening-Teste. Mit ihnen ist es möglich, Stoffe zeit- und kostengünstig toxikologisch bzw. ökotoxikologisch zu beurteilen. Diese Methoden bieten sich an, wenn:

- Informationen schnell verfügbar sein müssen,
- viele verschiedene Substanzen beurteilt werden sollen,
- eine Vorauswahl untersuchungswürdiger Stoffe erfolgen soll (Redmann, 1997).

Diese Teste erlauben eine erste Einschätzung des Gefährdungspotentials der Substanzen. Anhand einer Prioritätenliste können Substanzen von kostenintensiven weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden, wenn sie bereits in einem Screening z.B. den Verdacht auf ein mutagenes oder teratogenes Potential zeigen.

In der säugertoxikologischen Forschung existieren eine Reihe von in vitro Modellen (z.B. „Ames Test“, „Whole Embryo Culture“ mit Rattenembryonen, „Mouse Limb Bud Assay“), mit denen ein Screening durchgeführt bzw. spezielle Fragestellungen untersucht werden können. Sollen Alternativmethoden bestehende Tierversuche ersetzen, so muß eine bestimmte Vorgehensweise eingehalten werden. Diese beinhaltet die Testentwicklung, die Validierung im Labor, die Validierung zwischen verschiedenen Laboratorien und die Schaffung und Bewertung einer Datenbasis. Die Prüfung und Beurteilung erfolgt unabhängig vom Entwickler der Methode. Nur daraus kann eine breite Akzeptanz des neuen Testes resultieren (Balls & Clothier, 1991; Balls et al., 1991).

¹ Teratogenität : spezifische Wirkung einer Noxe auf die Entwicklung des Embryos oder Fetus, die zu funktionalen oder strukturellen Fehlbildungen führen kann.

Als mögliche Alternative zu Untersuchungen mit Säugetieren bzw. Organen oder Organteilen von Säugetieren wurde ein Testmodell mit Embryonen des Zebrafisches (*D. rerio*) entwickelt. *D. rerio* stellt in der Entwicklungsbiologie und Genetik ein wichtiges Modell für Vertebraten dar (Dooley & Zon, 2000; Nüsslein-Volhard, 1994 ; Kimmel, 1989). Er wird in der Ökotoxikologie und Toxikologie häufig als Testorganismus eingesetzt und neben anderen Arten als Testfisch nach dem Chemikaliengesetz vorgeschlagen (Nagel & Isberner, 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu klären, ob sich mit den Embryonen von *Danio rerio* ein teratogenes Potential von Substanzen erkennen und quantifizieren läßt. Dazu wurde der Embryotest nach Schulte & Nagel (1994) um teratogene Endpunkte erweitert und *DarT* („*Danio rerio* Teratogenicity Assay“) als Teratogenitäts-Screening Test entwickelt.

Im *DarT* können anhand von exakt definierten toxikologischen Endpunkten sowohl die letalen als auch die subletalen Wirkungen von Substanzen bestimmt werden. Darüber hinaus werden anhand von teratogenen Endpunkten speziell Malformationen erfaßt. Der Vergleich der beobachteten Effekte und der daraus berechneten Wirkkonzentrationen gestattet eine Einschätzung des teratogenen Potentials von Substanzen. Die im *DarT* erzielten Ergebnisse werden mit der bekannten Zuordnungen des „säugerteratogenen“ Potentials verglichen.

Die Embryonen von *D. rerio* werden 48 Stunden unter definierten Bedingungen gegenüber verschiedenen Substanzen exponiert. Eine Gruppe umfaßt 21 Substanzen, die beim Menschen bzw. bei Untersuchungen mit Säugetieren teratogene Effekte verursachen. Weiterhin wurden 17 Stoffe ausgewählt, die als „nicht säugerteratogen“ eingestuft sind. Eine dritte Gruppe umfaßt drei Substanzen, für die keine klare Zuordnung vorliegt.

Anhand dieser Untersuchungen wurde nach der Testentwicklung das Testsystem *DarT* einer ersten Bewertung unterzogen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

Nachfolgend sind die verwendeten Geräte und Materialien aufgeführt.

Testvorbereitung und Eigewinnung:

Abdeckgitter, Edelstahl, Maschenweite: 3 mm
 Aquarien – Glas, Silikonfugen, 80 L
 Aquarium-Durchlüfter ELITE 802
Artemia spec.-Cysten

Assistent-Instrumentenschale, Glas
 Aufzuchtfutter Tetra AZ
 Außenfilter Eheim classic 2213
 Konduktometer LF 191
 Feinwaage Sartorius Research RC 210S
 Fischfutter TetraMin, Hauptfutter
 Flachbodenschale, Glas, 150 mL
 Halb-Mikrowaage Sartorius Research R 160P
 Knauer Kryoskopiegerät, Typ 24.00
 Kolbenhubpipetten, verschiedene Volumina
 Kunststoff-Sieb, Maschenweite: 0,5 mm
 Microprocessor Oximeter Oxi 3000
 Pflanzenimitat, Glas
 pH-Meter pH 522
 Vollpipetten, macro-Pipettierhelfer

Differenzierung und Exposition:

Bechergläser, Borosilikatglas
 Illumination Base SZH-ILLK
 Laborheiztisch und Mikroskopisch HAT 200
 Meßkolben, Borosilikatglas
 Stereomikroskop SZ 4045 TR

Test und Dokumentation:

Brutkühlschrank BK 6160
 Deckfolie Fasson S 695, Polystyren
 Diafilm Kunstlicht, Ektachrome 64 T
 Inversmikroskop IMT 2
 Kleinbildkamera SC 35
 Monitor Panasonic TC 1470 Y
 Multischalen, Polystyren, 24 × 3,4 mL
 Solid-State CCD Kamera
 Standard-PC mit Software
 Videofilm EQ 300
 Videorecorder Panasonic AG 6730

Werkstatt TU Dresden
 Zoohandel Skalar, Dresden
 Firma Weltweit, Holm
 Sanders Brine Shrimp Company, Inc., Ogden, Utah, USA
 Glaswarenfabrik K. Hecht GmbH, Sondheim
 TetraWerke GmbH, Melle
 Eheim GmbH & Co, KG, Deizisau
 WTW GmbH, Weilheim
 Sartorius GmbH, Göttingen
 TetraWerke GmbH, Melle
 Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
 Sartorius GmbH, Göttingen
 Herbert Knauer GmbH, Berlin
 Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
 WTW GmbH, Weilheim
 Firma Annemüller, Mainz
 WTW GmbH, Weilheim
 Brand GmbH & Co, Wertheim
 Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
 Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan
 Minitüb GmbH, Tiefenbach
 Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
 Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan
 Heraeus Instruments GmbH, Hanau
 Nunc GmbH, Wiesbaden
 Kodak Ltd., GB
 Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan
 Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan
 Matsushita Co., Ltd., Osaka, Japan
 Nunc GmbH, Wiesbaden
 Cohu Inc., San Diego, USA
 Microsoft, USA
 BASF AG, Ludwigshafen
 Matsushita Co., Ltd., Osaka, Japan

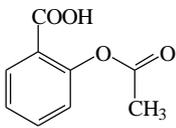
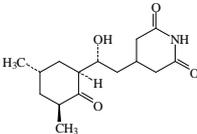
2.2 Testsubstanzen

Im folgenden Kapitel werden die ausgewählten Testsubstanzen kurz charakterisiert. Die für die Durchführung der Teste wichtigen physikalisch-chemischen Daten und ausgewählte Toxizitätsdaten sind aufgeführt. Weitere Informationen zu Wirkungen der Substanzen werden im Kapitel „Ergebnisse und Diskussion“ diskutiert. Reinheitsgrad und Bezugsquelle sind der Tab. A 1 im Anhang A zu entnehmen.

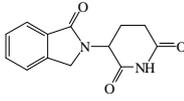
Die Substanzen, die beim Menschen bzw. im Tierexperiment teratogene Effekte verursachen, sind in Tab. 1 zusammengestellt. Sie werden nachfolgend als „säugerteratogen“ bezeichnet. Tab. 2 (Seite 7) beinhaltet diejenigen Substanzen, für die bei Säugetieren (nachfolgend als „Säuger“ bezeichnet) kein teratogenes Potential bekannt ist. Substanzen, die bei Untersuchungen mit Säugetieren keine eindeutigen Befunde hinsichtlich der Teratogenität liefern, bilden die dritte Gruppe. Sie sind in Tab. 3 auf Seite 9 zusammengefaßt.

Tab. 1: Teratogene Testsubstanzen

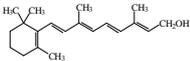
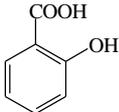
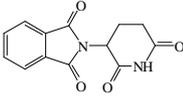
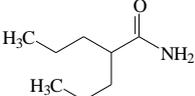
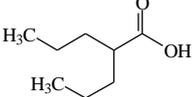
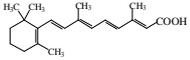
Die Angaben zur akuten Toxizität bei Ratte und Maus stellen LD₅₀-Werte bei oraler Applikation dar (Lewis, 2000). Physikalisch-chemische Daten aus Rippen (1990); HSDB (2001) und Merck (1997).

Substanz [CAS] Synonyma	Formel	Verwendung / Kurzbeschreibung	physikalisch- chemische Daten	akute Toxizität
Acetylsalicylsäure [50-78-2]	C ₉ H ₈ O ₄	Analgetikum, Entzündungshemmer	M : 180,16 pK _s : 3,49 log K _{OW} : 1,19 p : 3,36*10 ⁻⁵ H : 1,32*10 ⁻⁴ L _w : 4600mg/L	Maus: 250 mg/kg Ratte: 200 mg/kg
Aspirin				
Blei(II)-acetat-Trihydrat [6080-56-4]	C ₄ H ₆ O ₄ Pb*3H ₂ O	chemisches Reagenz	M : 379,34	Ratte: 4665 mg/kg
Bleizucker				
Cycloheximid [66-81-9]	C ₁₅ H ₂₃ NO ₄	Proteinsynthese- hemmer	M : 281,35 L _w : 21g/L	Maus: 133 mg/kg Ratte: 2 mg/kg
Actidion				
Diethylenglykol- dimethylether [111-96-6]	C ₆ H ₁₄ O ₃	Lösungsmittel Reaktionsmedium	M : 134,17 log K _{OW} : - 0,36 p : 2,3 H : 0,041 L _w : mischbar	Maus: 2.978 mg/kg Ratte: 4.760 mg/kg <i>L. idus</i> : > 2.000 mg/L
Diglyme				
N,N-Dimethylformamid [68-12-2]	C ₃ H ₇ NO	Lösungsmittel	M : 73,09 log K _{OW} : -1,01 p : 3,53 H : 7,47 x 10 ⁻⁵ L _w : vollständig	Maus: 3.750 mg/kg Ratte: 2.800 mg/kg <i>P. promelas</i> : 10700 mg/L ⁵
DMF				

Fortsetzung Tab. 1

Substanz [CAS] Synonyma	Formel	Verwendung / Kurzbeschreibung	physikalisch- chemische Daten	akute Toxizität
a-EM 12 [26581-81-7]	C ₁₃ H ₉ N ₂ O ₃	Thalidomid-Derivat	M : 241,23	Maus: 6.000 mg/kg Ratte: 1.830 mg/kg (ipr.)
				
Ethanol [64-17-5]	C ₂ H ₆ O	Lösungsmittel, Desinfektionsmittel, pharmazeutisches Hilfsmittel	M : 46,07 log K _{OW} : -0,31 p : 58 H : 0,14*10 ⁻³ L _W : vollständig	Maus: 3.450 mg/kg Ratte: 7.060 mg/kg <i>L. idus</i> : 9000 mg/L
Hydroxyharnstoff [127-07-1]	CH ₄ N ₂ O ₂	Antineoplastikum DNA-Synthese- Hemmer	M : 76,05 L _W : löslich	Maus: 7.330 mg/kg Ratte: 5.760 mg/kg
N-Carbamoyl- hydroxylamin				
Methoxyessigsäure [625-45-6]	C ₃ H ₆ O ₃	Metabolit des 2-Methoxyethanol	M : 90,08 p : 180 Pa (20°C)	Ratte LDLo: 2.000 mg/kg
Methoxyessigsäureiso- propylester [17640-21-0]	C ₆ H ₁₂ O ₃	Syntheseprodukt (BASF AG)	M : 132,16 p : 7 (33,5°C) L _W : 90 g/L	Ratte: > 2.000 mg/kg ¹ <i>D. rerio</i> : 12 mg/L ¹
2-Methoxyethanol [109-86-4]	C ₃ H ₈ O ₂	Lösungsmittel Ausgangsstoff für Methylglykolether und Methylglykol- acetat	M : 76,10 log K _{OW} : - 0,61 p : 8,1 H : 11.750,8 L _W : unbegrenzt	Maus: 2.560 mg/kg Ratte: 2.460 mg/kg <i>L. idus</i> : >10.000 mg/L ⁶
Methylglykol; Ethylen- glykolmonomethylether				
Methylcarbamoylcystein	C ₅ H ₁₀ O ₃ N ₂ S	Metabolit des N,N- Dimethylformamid	M : 178,21	
Methylcarbamoyl- glutathion	C ₁₂ H ₂₀ O ₇ N ₄ S	Metabolit des N,N- Dimethylformamid	M : 364,37	
N-Methylformamid [123-39-7]	C ₂ H ₅ NO	Lösungsmittel	M : 59,07 log K _{OW} : -0,624 p : 4,1x10 ⁻² (25°C) H : 3,1x10 ⁻² (25°C) L _W : <10%	Maus: 2.600 mg/kg Ratte: 4.000 mg/kg
N-Monomethylformamid; NMF				
Methylquecksilber- chlorid [115-09-3]	CH ₃ HgCl	Methylquecksilber: Beizmittel, Pestizid, mikrobielles Stoff- wechselprodukt	M : 251,08 L _W : gering	Maus: 57,6 mg/kg Ratte: 29,9 mg/kg

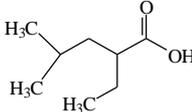
Fortsetzung Tab. 1

Substanz [CAS] Synonyma	Formel	Verwendung / Kurzbeschreibung	physikalisch- chemische Daten	akute Toxizität
all-trans-Retinol [68-26-8] Vitamin A	$C_{20}H_{30}O$ 	essentiell, Vitamin	M : 286,46 L _W : gering	Maus: 1.510 mg/kg Ratte: 2.000 mg/kg
Salicylsäure [69-72-7] 2-Hydroxybenzoesäure	$C_7H_6O_3$ 	Desinfektionsmittel	M : 138,12 pK _S : 2,97 log K _{OW} : 2,26 p : 10 (100°C) H : 7,44*10 ⁻⁴ L _W : 2,059g/L	Maus: 480 mg/kg Ratte: 891 mg/kg <i>L. idus</i> : 90 mg/L ⁴
Thalidomid [50-35-1] N-Phthalyl- Glutarminsäure-Imid	$C_{13}H_{10}N_2O_4$ 	Immunomodulator, ehemals Sedativum	M : 258,23 log K _{OW} : 0,33 L _W : 45-60 mg/L	Maus: 2.000 mg/kg Ratte: 113 mg/kg
Valpromid [2430-27-5]	$C_8H_{17}NO$ 	Antiepileptikum	M : 143,23	Maus: 950 mg/kg Ratte: 890 mg/kg
Valproinsäure [99-66-1] Valproinsäure; 2-Propylpentansäure	$C_8H_{16}O_2$ 	Antiepileptikum	M : 144,21 pK _S : 4,6	Maus: 1.098 mg/kg Ratte: 670 mg/kg
Vitamin A-Säure [302-79-4] Tretinoin	$C_{20}H_{28}O_2$ 	Metabolit des all-trans-Retinol	M : 300,44	Maus: 216 mg/kg Ratte: 1.960 mg/kg

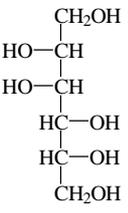
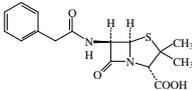
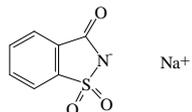
M : molare Masse (g/mol); pK_S : Dissoziationskonstante; log K_{OW} : n-Octanol – Wasser – Verteilungskoeffizient; p : Dampfdruck (mbar) bei 20°C; H : Henry-Konstante bei 20°C; L_W : Wasserlöslichkeit bei 25°C (mg/L); *C. auratus* : *Carassius auratus*; *L. idus* : *Leuciscus idus melanotus*; *L. macrochirus* : *Lepomis macrochirus*; *P. promelas* : *Pimephales promelas* - alle Konzentrationsangaben LC₅₀; 1 : BASF (1999); 2 : Streit (1994); 3 : Rippen (1990); 4 : Knie et al. (1983); 5 : BUA 84 (1992); 6 : Juhnke & Lüdemann (1978); 7 : BUA 173 (1996)

Tab. 2: Testsubstanzen ohne teratogenes Potential

Die Angaben zur akuten Toxizität bei Ratte und Maus stellen LD₅₀-Werte bei oraler Applikation dar (Lewis, 2000). Physikalisch-chemische Daten aus Rippen (1990); HSDB (2001) und Merck (1997).

Substanz [CAS] Synonyma	Formel	Verwendung / Kurzbeschreibung	physikalisch- chemische Daten	akute Toxizität
Aceton [67-64-1]	C ₃ H ₆ O	Lösungsmittel Extraktionsmittel Reaktionsmedium	M : 58,08 log K _{OW} : 0,58 p : 237 H : 3,9 L _W : vollständig	Maus: 3.000 mg/kg Ratte: 5.800 mg/kg <i>L. idus</i> : 7.500 mg/L ³
2-Propanon				
Butyldiglykol [112-34-5]	C ₈ H ₁₈ O ₃	Lösungsmittel	M : 162,23 p : 0,02 L _W : mischbar	Maus: 2.400 mg/kg Ratte: 5.660 mg/kg <i>L. idus</i> : 1805 mg/L ⁶
Diethylenglykolmono- butylether				
Diethylenglykol [111-46-6]	C ₄ H ₁₀ O ₃	Lösungsmittel Weichmacher Gefrierschutzmittel Zwischenprodukt	M : 106,12 log K _{OW} : 1,0 p : 0,03 H : 0,014*10 ⁻⁶ L _W : mischbar	Maus: 23.700 mg/kg Ratte: 12.565 mg/kg <i>L. idus</i> : > 10.000 mg/L ²
Bis(2-hydroxyethyl)- ether				
Ethylacetat [141-78-6]	C ₄ H ₈ O ₂	pharmazeutisches Hilfs- und Reinigungsmittel	M : 88,11 p : 95 (20°C) log K _{OW} : 0,69 H : 7143 (20°C) L _W : 77 g/L	Maus: 4.100 mg/kg Ratte: 5.620 mg/kg <i>L. idus</i> : 330 mg/L
Essigsäureethylester		Lösungsmittel polares Narkotikum		
α-D-Glucose [492-62-6]	C ₆ H ₁₂ O ₆	Naturstoff, Süßungsmittel	M : 180,16 pK _S : 12,92; 0°C log K _{OW} : -3,24 L _W : 1200 g/L (30°C)	Maus iv.: 9.000 mg/kg Ratte: 25.800 mg/kg
α-D-Glucopyranose				
2,5-Hexandion [110-13-4]	C ₆ H ₁₀ O ₂	Lösungsmittel für Lacke und Farben, Zwischenprodukt	M : 114,14 p : 0,6 L _W : mischbar	Maus: 2.386 mg/kg Ratte: 2.076 mg/kg
Isobutyl-ethyl- Valpronsäure	C ₈ H ₁₆ O ₂	Struktur analogon der Valpronsäure	M : 144,21	
				
Kupfer(II)sulfat- Pentahydrat [7758-99-8]	CuSO ₄ *5H ₂ O	Fungizid	M : 249,68 L _W : 243 g/L	Maus ipr: 33 mg/kg Ratte: 300 mg/kg
Kupfervitriol				

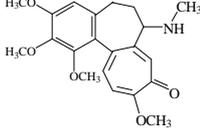
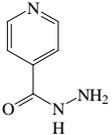
Fortsetzung Tab. 2

Substanz [CAS] Synonyma	Formel	Verwendung / Kurzbeschreibung	physikalisch- chemische Daten	akute Toxizität
D-Mannitol [69-65-8] Mannit	$C_6H_{14}O_6$ 	Süßstoff, Diuretikum	M : 182,17 pK _S : 13,5 (18°C) log K _{OW} : -3,10 p : 6,53*10 ⁻⁹ H : 7,39*10 ⁻⁸ L _W : ca. 116 g/L	Maus: 22.000 mg/kg Ratte: 13.500 mg/kg
1-Methoxy-2-propanol [107-98-2] Propylenglykol- monomethylether	$C_4H_{10}O_2$	Lösungsmittel, Reinigungsmittel- zusatz	M : 90,12 p : 115 L _W : mischbar	Maus: 11.700 mg/kg Ratte: 5.660 mg/kg <i>L. idus</i> : >4600 mg/L ⁷
3-Methyl-1-butanol [123-51-3] iso-Amylalkohol	$C_5H_{12}O$	Lösungsmittel für Fette und Harze; Gebrauch in Mikroskopie	M : 88,15 log K _{OW} : 1,16 p : 3,16 H : 1,43 L _W : 26,7 g/L	Maus ipr.: 233 mg/kg Ratte: 1.300 mg/kg
Penicillin G-Natriumsalz [69-57-8]	$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$ 	Antibiotikum	M : 356,37	Maus iv: 1.500 mg/kg Ratte: 6.916 mg/kg
Saccharin-Natriumsalz- Dihydrat [82385-42-0] 2-Sulfobenzoessäureimid Natriumsalz	$C_7H_4NO_3Na \cdot 2H_2O$ 	Süßstoff	M : 241,19 L _W : 833,33 g/L	

M : molare Masse (g/mol); pK_S : Dissoziationskonstante; log K_{OW} : n-Octanol – Wasser – Verteilungskoeffizient; p : Dampfdruck (mbar) bei 20°C; H : Henry-Konstante bei 20°C; L_W : Wasserlöslichkeit bei 25°C (mg/L); *L. idus* : *Leuciscus idus melanotus*; - alle Konzentrationsangaben LC₅₀; 2 : Streit (1994); 3 : Rippen (1990); 6 : Juhnke & Lüdemann (1978); 7 : BUA 173 (1996)

Tab. 3: Testsubstanzen ohne klare Zuordnung

Die Angaben zur akuten Toxizität bei Ratte und Maus stellen LD₅₀-Werte bei oraler Applikation dar (Lewis, 2000). Physikalisch-chemische Daten aus Rippen (1990); HSDB (2001) und Merck (1997).

Substanz [CAS] Synonyma	Formel	Verwendung / Kurzbeschreibung	physikalisch- chemische Daten	akute Toxizität
Colcemid [477-30-5]	C ₂₁ H ₂₅ NO ₅	Antineoplastikum	M : 371,43	Maus: 25,5 mg/kg Ratte iv.: 1,7 mg/kg
Demecolcin				
Isoniazid [54-85-3]	C ₆ H ₇ N ₃ O	Tuberkulostatikum	M : 137,14 L _w : 14 %	Maus: 133 mg/kg Ratte: 1.250 mg/kg
Isonicotinsäurehydrazid				
2-Propanol [67-63-0]	C ₃ H ₈ O	Lösungsmittel Extraktionsmittel Desinfektionsmittel	M : 60,10 log K _{OW} : 0,28 p : 42 H : 0,3x10 ⁻³	Maus: 3.600 mg/kg Ratte: 5.045 mg/kg <i>L. idus</i> : 9000 mg/L ²
Isopropanol			L _w : vollständig	

M : molare Masse (g/mol); log K_{OW} : n-Octanol – Wasser – Verteilungskoeffizient; p : Dampfdruck (mbar) bei 20°C; H : Henry-Konstante bei 20°C; L_w : Wasserlöslichkeit bei 25°C (mg/L); *L. idus* : *Leuciscus idus melanotus* - Konzentrationsangabe LC₅₀; 2 : Streit (1994)

2.3 Testorganismus

2.3.1 Der Zebrafisch (*Danio rerio*)

Die Untersuchungen wurden mit Embryonen des Zebrafisches *Danio rerio* durchgeführt. Dieser Schwarmfisch besiedelt Gewässer des östlichen Vorderindiens, Bengalens und Bangladeschs (Weiss, 1983). Innerhalb der Osteichthyes gehört *D. rerio* zu den Cyprinidae (Storch & Welsch, 1991).

Aufgrund der ganzjährigen täglichen Produktion einer großen Anzahl transparenter, nicht klebender Eier und aufgrund der einfachen Haltung wird er in der Ökotoxikologie und Toxikologie häufig als Testorganismus eingesetzt (Nagel & Isberner, 1998; Herrmann, 1995). In der Entwicklungsbiologie und Genetik ist er ein wichtiges Modell für Vertebraten (Dooley & Zon, 2000; Nüsslein-Volhard, 1994 ; Kimmel, 1989). *D. rerio* wird neben weiteren Arten als Testfisch nach dem Chemikaliengesetz vorgeschlagen (Nagel & Isberner, 1998). Die Tiere werden nach etwa drei Monaten geschlechtsreif und eignen sich daher auch für Langzeituntersuchungen wie dem "Complete life-cycle test" (Nagel & Isberner, 1998; Nagel, 1994).

2.3.2 Embryonalentwicklung

Zur Beurteilung der Chemikalienwirkung und zur Bewertung von Fehlentwicklungen ist eine genaue Kenntnis der Embryonalentwicklung des Zebrafisches Voraussetzung. In der Literatur existieren vielfältige und umfangreiche Beschreibungen. Beispielfähig seien die Arbeiten von Kimmel et al. (1995), Laale (1977) oder Hisaoka & Battle (1958) angeführt.

Hier wird nur kurz der für die nachfolgend beschriebene Testmethode relevante Abschnitt der Ontogenese von *D. rerio* dargestellt. Die ersten 48 Stunden der Embryonalentwicklung beinhalten die wichtigsten Differenzierungsprozesse der Fische und wahrscheinlich die teratogenen Determinationsperioden der Wirbeltierentwicklung.

Die Eier von *D. rerio* sind telolezithal. Frisch abgelaicht haben sie einen Durchmesser von 0,7 mm. Das 1,5 bis 2 µm dicke Chorion ist aus drei Schichten aufgebaut, wobei die beiden inneren Schichten von Poren (Durchmesser: 0,2 µm) durchsetzt sind. Die äußere Schicht ist homogen und etwa 0,1 µm dick (Hart & Donovan, 1983).

Durch Wasserkontakt wird die Eiaktivierung und die Corticalreaktion ausgelöst. Dabei brechen Corticalgranulae auf und geben ihren Inhalt in den Perivitellinraum ab. Dieser entsteht, indem sich das Chorion vom animalen Pol her abhebt (Hart & Yu, 1980). Im animalen Bereich wird auf dem Dotter aufsitzend die Keimscheibe ausgebildet (Wolenski & Hart, 1987). Diese Vorgänge laufen unabhängig von einer Befruchtung ab. Diese erfolgt, indem der Kopf des Spermiums in die am animalen Pol befindliche Mikropyle eindringt. Die Morphologie von Mikropyle und Spermiumkopf sind aufeinander abgestimmt, so daß Polyspermie ausgeschlossen wird (Hart & Donovan, 1983). Endoplasma strömt entlang der anterior - posterior orientierten Mikrotubuli in die Keimscheibe (Beams et al., 1985). Eine Umverteilung von Plasma ist ebenfalls während der folgenden frühen Furchungsstadien zu beobachten. Die meroblastische Furchung beschränkt sich auf den dotterfreien Bereich der Keimscheibe und wird als partiell-discoidal bezeichnet (Remane et al., 1989). Der Durchmesser des Eies beträgt nun ca. 1 mm (Hisaoka & Battle, 1958).

Etwa 35 Minuten nach der Befruchtung vollzieht sich in animal-vegetativer Richtung die erste Zellteilung. Die Keimscheibe wird in zwei gleich große, vertikal getrennte Blastomere geteilt. Die ersten Furchungen sind meroblastisch, so daß bis zur sechsten Furchung die gebildeten 32 Blastomeren mittels cytoplasmatischer Verbindungen untereinander und mit dem Dotter in Kontakt stehen (Kimmel et al., 1995). Die Dotterströmungen lassen nach der sechsten Furchung nach (Kimmel & Law, 1985a), die etwa 120 Minuten nach der Befruchtung den Embryo horizontal in zwei Zelllagen teilt.

Die folgenden späteren Furchungen verlaufen zunehmend asynchron und führen zweieinhalb bis drei Stunden nach der Befruchtung zur hohen Blastula, die eine fein granuliert Struktur aufweist (siehe Abb. 1 a). Basal vom Blastoderm entsteht ein dotterfreies, mehrkerniges Synzytium. Kimmel & Law (1985b) bezeichnen es als "yolk syncytial layer". Dieser aus marginalen Blastomeren entstandene Periblast liegt dem Dotter auf. Das Blastoderm ist nun in zwei Schichten differenziert: eine animal orientierte einlagige Deckschicht, die als Epiblast bezeichnet wird und der dem Dotter aufliegende Hypoblast. Zwischen Hypo- und Epiplast befinden sich sogenannte "deep cells" (Kimmel & Law, 1985b).

Fünf Stunden nach der Befruchtung beginnt die Epibolie. In dieser auch als Gastrulation bezeichneten Phase (Sander & Baumann, 1983) kommt es durch Zellteilung und -verlagerung zum Umwachsen des Dotters durch das Blastoderm in Richtung des vegetativen Poles.

Acht Stunden nach der Befruchtung ist der Dotter zu 3/4 umwachsen (Jones & Huffman, 1957). An der verdickten Epiboliefront fand eine Einwanderung von Zellen statt. Der Embryonschild wird in einem Bereich des Blastoderms ausgebildet. Aus ihm bildet sich die longitudinale Embryonalachse, aus der sich die Chorda entwickelt.

Zwölf Stunden nach der Befruchtung ist die Epiboliebewegung beendet und der Blastoporus geschlossen. Kopfanlage und Schwanzknospe sind zu erkennen. Innerhalb der nächsten zwei Stunden werden die Anlage der Augen und die ersten Somitenpaare sichtbar, aus denen sich hauptsächlich Wirbel und die Körpermuskulatur entwickeln. Bei $26 \pm 1^\circ\text{C}$ sind nach 17 Stunden 8 ± 2 Somitenpaare ausgebildet (Schulte, 1997).

Nach 20 Stunden beginnt der Schwanz sich durch Längenwachstum vom Dotter abzuheben. Schon während dieser Ablösung setzen Spontanbewegungen ein, die im Verlauf der weiteren Entwicklung intensiver werden. Nach 22 Stunden haben die Embryonen ca. 20 Somitenpaare gebildet (Schulte, 1997).

24 Stunden nach der Befruchtung ist der Schwanz vom Dotter abgelöst (siehe Abb. 1 b) und der Embryo bewegt sich stark. Die Körperlänge des Embryos beträgt jetzt 1,9 mm (Kimmel et al., 1995). Augen- und Gehirnanlage sind deutlich sichtbar, das Notochord ist bis zur Schwanzspitze ausgebildet. Das Herz wurde in den Wandschichten des Dottersackes gebildet und beginnt zu kontrahieren, noch bevor es unter den Kopf verlagert wird (Kimmel et al., 1995; Sander & Baumann, 1983).

36 Stunden nach der Befruchtung ist die Gehirnanlage mit fünf Ventrikel erkennbar (Hisaoaka & Firlit, 1960). Die Pigmentierung setzt zuerst im Bereich der Retina ein. Erste Melanocyten sind ebenfalls am Kopf und am Dottersack zu erkennen. Charakteristisch für dieses Stadium ist die Bildung der Brustflossen. Nach 37 Stunden lässt sich der Blutkreislauf sehr gut an der Bewegung der Blutzellen im Bereich des Augenspaltes und anhand der Durchblutung der Aorta dorsalis beobachten.

Bei den Embryonen steigt die Herzfrequenz mit zunehmendem Entwicklungsalter, wobei sich die Steigerungsrate mit zunehmendem Alter reduziert. Nach 49 Stunden ist der Herzschlag regelmäßig und die mittlere Frequenz nimmt zu diesem Zeitpunkt nur noch um zwei Schläge pro Stunde zu. Die Herzfrequenzen innerhalb einer Altersgruppe variieren im Vergleich zu früheren Entwicklungsstadien weniger (Zeller, 1995). Die Otolithen sind zu diesem Zeitpunkt deutlich ausgebildet, wurden aber schon nach 20 Stunden angelegt (Kimmel et al., 1995). Sie befinden sich in den Sacculi und dienen als Bestandteil des stato-akustischen Organs dem Gleichgewichtssinn. Die Melanocyten auf der Körperoberfläche sind streifenförmig angeordnet. Der Embryo führt kräftige Schwanzschläge aus, allerdings seltener als nach 24 Stunden. Abb. 1 c zeigt einen 49 Stunden alten Embryo.

Die Embryonen schlüpfen bei $26 \pm 1^\circ\text{C}$ nach vier Tagen. Untersuchungen von Hisaoaka & Battle (1958) bestätigen diese Beobachtungen, während Jones & Huffman (1957) hierfür drei Tage angeben. Der Zeitpunkt variiert von Embryo zu Embryo und ist abhängig vom Milieu und der mechanischen Belastung des Chorions.



Abb. 1: Ausgewählte Stadien der Embryonalentwicklung von *D. rerio*

a : „hohe Blastula“ – 2,5 Stunden nach der Befruchtung (60fache Vergrößerung); b : 25 Stunden alter Embryo (40fache Vergrößerung); c : 49 Stunden alter Embryo (40fache Vergrößerung)

2.4 Testmethode

2.4.1 Hälterung der Elterntiere und Eigewinnung

Die Fische stammten aus Nachzuchten von Tieren der Firma Westaquarium, Bad Lauterbach. Adulte Zebraärblinge wurden in 80-L-Aquarien bei $26 \pm 1^\circ\text{C}$ und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden gehalten. Die Reinigung des Wassers erfolgte über Außenfilter. Zusätzlich wurden täglich 10 % des Aquarienwassers gegen aktivkohlegefiltertes und belüftetes Leitungswasser ausgetauscht. Physikalisch-chemische Wasserparameter wurden stichprobenartig kontrolliert. Die Tiere erhielten täglich zweimal Trockenfutter und einmal ad libitum Nauplien von *Artemia spec.*.

In Anlehnung an Nagel (1986) wurde für die Eiproduktion ein Geschlechterverhältnis von zwei Milchnern zu einem Rogner gewählt, wobei 45 Tiere eine Laichgruppe bildeten. Vor dem Ausschalten des Lichtes wurden Laichschalen (Assistent-Instrumentenschalen) in die Becken gestellt. Die als Laichsubstrat verwendeten Pflanzenimitate wurden auf Edelstahlgittern befestigt, die die Laichschalen abdeckten. Morgens wurde durch das Einschalten des Lichtes die Balz ausgelöst. Ein Rogner wurde meist von mehreren Milchnern zwischen die Pflanzenimitate getrieben. Die abgegebenen und von den Milchnern in eine Spermienwolke gehüllten Eier sanken auf den Boden der Laichschalen. Nach der Entnahme der Laichschalen wurden die Eier vorsichtig in einem Sieb aufgefangen und mehrmals mit rekonstituiertem Wasser gespült.

Damit die Tiere regelmäßig ablaichen konnten, wurden die Laichschalen täglich in die Aquarien eingebracht. Diese Vorgehensweise garantierte eine sehr gute Befruchtungsrates bei gleichzeitig geringem Auftreten atretischer, d. h. vollständig angelegter, jedoch bereits im Rogner denaturierter Eier (Nagel, 1986).

2.4.2 Testvorbereitung

Von der Testsubstanz wurden aus einer Stammlösung verschiedene Konzentrationen hergestellt. Vom Kontrollmedium und von jeder Konzentration wurden der pH-Wert und die Sauerstoffsättigung bestimmt. Die Sauerstoffsättigung sollte $> 80\%$ betragen. Der für den Test zulässige pH-Wert-Bereich beträgt $4,5 - 9,0$. In diesem Bereich wurde kein schädigender Einfluß auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio* festgestellt (Schulte, 1997; Herrmann, 1993).

Bestand der Verdacht, daß osmotische Effekte durch hohe Konzentrationen der Testsubstanzen verursacht werden könnten, wurde zusätzlich die Osmolarität bestimmt (siehe 2.4.7, Seite 15).

Der eigentliche Test wurde in 24 Well-Multischalen aus Polystyren durchgeführt. Vier Wells pro Schale dienten als interne Kontrolle und wurden mit je 2 mL rekonstituiertem Wasser befüllt. Die übrigen 20 Wells einer Multischale wurden mit je 2 mL einer Konzentration der Testlösung befüllt. Somit konnten je Konzentration und Kontrolle 20 Embryonen untersucht werden. Multischalen und Bechergläser mit der restlichen Testlösung wurden in einem Kühlbrutschrank auf $26 \pm 1^\circ\text{C}$ temperiert.

2.4.3 Exposition und Differenzierung

Beobachtungen von Sander & Baumann (1983) zufolge ist eine Exposition der Eier innerhalb der ersten zwei Stunden notwendig, da eine einzige frühe Entwicklungsanomalie eine ganze Kette von Folgeschäden nach sich ziehen kann.

Um eine frühzeitige und zeitlich einheitliche Exposition zu gewährleisten, wurden direkt nach der Eigewinnung jeweils ca. 40 Eier in die vorbereiteten Bechergläser mit den verschiedenen Konzentrationen überführt. Anschließend erfolgte die Differenzierung in befruchtete und unbefruchtete Eier. Mittels eines Stereomikroskopes wurde je ein befruchtetes Ei² in jedes Well der Multischalen überführt. Die Embryonen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Vier- bis 16-Zellstadium. Die Schalen wurden anschließend mit einer Polystyrenfolie abgedeckt, um das Verdunsten des Mediums und somit Konzentrationsänderungen zu verhindern. Des Weiteren kann sich bei Substanzen mit höherem Dampfdruck ein Gleichgewicht zwischen Wasser- und Gasphase einstellen, da diese nicht ungehindert entweichen können.

Die pro Well verbleibenden 1,4 mL Luftraum und die im Testmedium gelöste Menge an Sauerstoff reichten aus, um eine Versorgung der Embryonen während der folgenden 48 Stunden zu gewährleisten. Nach Ensenbach (1987) beträgt der Sauerstoffverbrauch eines Embryos ca. $1,8 \mu\text{g}$ in 48 Stunden. Dies entspricht etwa 12% des pro Well vorhandenen Sauerstoffs, wenn man von einem Sauerstoffgehalt der Testlösung von $7,5 \text{ mg/L}$ ausgeht. Dabei wurde die Nachdiffusion aus dem Luftraum in das Medium nicht berücksichtigt.

² Befruchtete Eier werden folgend als Embryonen bezeichnet, unabhängig davon, in welchem Entwicklungsstadium sie sich befinden.

Während des Testes befanden sich die Multischalen bei $26 \pm 1^\circ\text{C}$ in einem Kühlbrutschrank. Das Licht-Regime war entsprechend der Haltung der adulten Tiere auf jeweils 12 Stunden festgelegt. Die Embryonen wurden statisch exponiert.

2.4.4 Testmedium

Für die Vergleichbarkeit der Untersuchungen war es erforderlich, gleiche Testbedingungen zu schaffen. Die Zusammensetzung des verwendeten Mediums hat einen starken Einfluß auf Verfügbarkeit und Toxizität von Substanzen (Meinelt & Stüber, 1995; Zitko & Carson, 1976). Als einheitliches Verdünnungs- und Testmedium diente rekonstituiertes Wasser folgender Zusammensetzung:

400 $\mu\text{mol/L}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
100 $\mu\text{mol/L}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
154 $\mu\text{mol/L}$ NaHCO_3
15 $\mu\text{mol/L}$ KCl

Zur Herstellung wurden Chemikalien mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ und doppelt deionisiertes Wasser (Nanopore, 18 M Ω) verwendet. Das rekonstituierte Wasser wurde bis zur Sauerstoffsättigung belüftet. Die Gesamthärte betrug $3 \pm 0,1^\circ\text{dH}$, der pH-Wert lag bei $7,4 \pm 0,4$.

Langjährige Erfahrungen zeigen, daß sich die Embryonen in diesem Medium ohne Einschränkung normal entwickeln (Maiwald, 1997; Schulte, 1997; Bachmann, 1996).

2.4.5 Konzentration und Aufnahme der Testsubstanzen

Die Exposition erfolgte über den gesamten Testzeitraum von 48 Stunden statisch. Die Konzentrationen wurden nicht analytisch überprüft, so daß alle Angaben Nominalkonzentrationen darstellen.

Um Effekte einer bestimmten Konzentration zuzuordnen und Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zu ermitteln, muß die Konzentration über den gesamten Testzeitraum konstant bleiben. Substanzen, die einen hohen Dampfdruck haben oder in aquatischen Systemen sehr instabil sind, können dementsprechend schlecht mit dem statischen Testsystem untersucht werden. In diesen Fällen sollte die Exposition semi-statisch oder im Durchfluß erfolgen. Zur Überprüfung der Konzentrationen besteht die Möglichkeit mit radioaktiv markierter Substanz zu arbeiten oder für die spezielle Testsubstanz ein Analyseverfahren zu etablieren (OECD, 1998). In der vorliegenden Arbeit sind diese Methoden nicht zur Anwendung gekommen.

Die Molekülgröße der Testsubstanz kann unter Umständen einen Einfluß auf ihre Bioverfügbarkeit haben, da die Substanz Chorion und Membranen überwinden muß, um an den Wirkort zu gelangen. Ensenbach (1987) konnte zeigen, daß verschiedene Phenole das Chorion passieren und durch Diffusion bis zum Embryo gelangen, so daß das Chorion keine Barriere für diese Fremdstoffe darstellt. Nach Maiwald (1997) gelangt Lindan in den Embryo und in den Dotter. Chorion, Perivitellinraum und Embryonalhülle stellen auch für diese Substanz keine Barriere dar. Wie Untersuchungen zur Toxikokinetik von Atrazin und Lindan zeigten, werden diese Substanzen gut in den Embryo aufgenommen (Görge & Nagel, 1990).

Es wird davon ausgegangen, daß die untersuchten Substanzen bis zum Ort ihrer spezifischen Wirkung gelangten.

2.4.6 Einsatz von Lösungsvermittlern

Lösungsvermittler können die Permeabilität von Membranen und die Verfügbarkeit der Testsubstanz am Wirkort beeinflussen. Aus diesem Grund wurde möglichst auf ihre Verwendung verzichtet. Einige der ausgewählten Substanzen sind jedoch durch eine sehr geringe Wasserlöslichkeit charakterisiert (z.B.: Retinoide). Wurden in Vorversuchen mit der maximal löslichen Substanzmenge keine Effekte verursacht, wurde DMSO (Dimethylsulf-oxid) als Lösungsvermittler in der Konzentration von 14,1 mmol/L eingesetzt. Diese Konzentration hat keinen Einfluß auf die Entwicklung der Embryonen von *D. rerio* (Maiwald, 1997).

2.4.7 Osmolarität der Testsubstanzen

Vor allem Salze, aber auch andere Substanzen können in hohen Konzentrationen die Embryonen durch osmotische Wirkungen schädigen. Effekte an den Embryonen würden somit keinen Hinweis auf einen substanzspezifischen Wirkmechanismus geben. Lange (1993) beschreibt für Harnstoff und Natriumchlorid starke osmotische Effekte an den Embryonen von *D. rerio*. Bläschen und Dottermaterial schnüren sich innerhalb weniger Stunden ab. Die Schädigung von Zellen und deren Membranen führt bereits nach zwölf Stunden zum Absterben und Denaturieren der Embryonen. Bis zu einem Wert von 100 mOsmol/L werden osmotische Effekte ausgeschlossen (Lange et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Osmolarität der Testlösungen ermittelt. Der zulässige Höchstwert betrug 100 mOsmol/L. Die Nachweisgrenze lag bei 4 mOsmol/L. Niedrigere Werte konnten nicht bestimmt werden und wurden als „nicht nachweisbar“ bezeichnet.

2.4.8 Toxikologische Endpunkte

Die Untersuchung erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten innerhalb der 48-stündigen Testdauer. Durch den Vergleich mit den Kontrollen konnten anhand toxikologischer Endpunkte Effekte an den exponierten Embryonen festgestellt werden. Nach Schulte (1997) müssen diese Endpunkte verschiedenen Kriterien erfüllen, um eine Abweichung von der Normalentwicklung möglichst objektiv zu beschreiben. Sie müssen toxikologisch relevant, gut zu unterscheiden und einfach zu messen sein. Die Embryonen dürfen nicht beeinträchtigt werden. Des weiteren müssen die Ergebnisse reproduzierbar sein und sich statistisch auswerten lassen.

Für die Charakterisierung und Bewertung eines möglichen teratogenen Potentials einer Substanz ist es notwendig, eine eindeutige Trennung zwischen letalen und subletalen Effekten vorzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Embryo nur dann als tot gewertet, wenn er koaguliert³ war. Subletale Endpunkte können Hinweise auf spezielle Wirkmechanismen von

³ Als koaguliert wird ein abgestorbener Embryo bezeichnet. Die denaturierten Strukturen erscheinen beim Mikroskopieren im Durchlicht dunkel, im Auflicht jedoch weißlich.

Substanzen geben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zwischen allgemein toxikologischen Endpunkten und Endpunkten für Malformationen unterschieden.

In Tab. 4 sind die allgemein toxikologischen letalen und subletalen Endpunkte und in Tab. 5 die teratogenen Endpunkte zusammengestellt. Neben grobstrukturellen Malformationen wurde nach 120 Stunden die Schwanzlänge der Larven erfaßt (siehe unten). In beiden Tabellen sind die Zeiten aufgeführt, zu denen die toxikologischen Endpunkte geprüft und Effekte protokolliert wurden. Ausgewählte Effekte zu den toxikologischen Endpunkten sind in Abb. 2 bis Abb. 5 (Seite 17 und 18) dargestellt.

Tab. 4: Allgemein toxikologische Endpunkte

Endpunkt	Expositionszeit (h)					Testzeit (h)
	2,5	8	24	36	48	120
koagulierter Embryo	◆	◆	◆	◆	◆	◆
hohe Blastula	●					
Gastrulation		●				
Spontanbewegung			●			
Somitenanlage			●	●	●	
Schwanzablösung vom Dotter [2a, b, 3b]			●	●	●	●
Augenanlage [2a]			●	●	●	●
Herzschlag				●	●	●
Blutkreislauf				●	●	●
Herzschlagfrequenz					●	
Pigmentierung [3b]					●	●
Oedeme [3b]					●	●

◆ : letal; ● : subletal; [...] : Nummer der Abbildung (Seite 17)

Tab. 5: Teratogene Endpunkte

Endpunkt	Expositionszeit (h)			Testzeit (h)
	24	36	48	120
Augendeformation	●	●	●	●
Kopfdeformation	●	●	●	●
Chordastruktur	●	●	●	●
Chordadeformation [3a]	●	●	●	●
Schwanzdeformation [3b]	●	●	●	●
deformierte Schwanzspitze [2b, 3b]	●	●	●	●
Spaltembryo [4a]	●	●	●	●
Veränderung des Dotters	●	●	●	●
Herzdeformation [4b]			●	●
Sacculi und Otolithen [3b]			●	●
Körperverkrümmung [5b]				●
Schwanzlänge				●

● : subletal (teratogen); [...] : Nummer der Abbildung (Seiten 17 und 18)



Abb. 2: Verzögerte Schwanzablösung vom Dotter

a : Schwanz nicht abgelöst, „diffuse“ Augenanlage, 24 h, 3,6 $\mu\text{mol/L}$ Cycloheximid (50fache Vergrößerung); b : Schwanz unvollständig abgelöst, Chordadeformation, deformierte Schwanzspitze, Perikardoedem, 48 h, 123 $\mu\text{mol/L}$ Valproinsäure (50fache Vergrößerung)

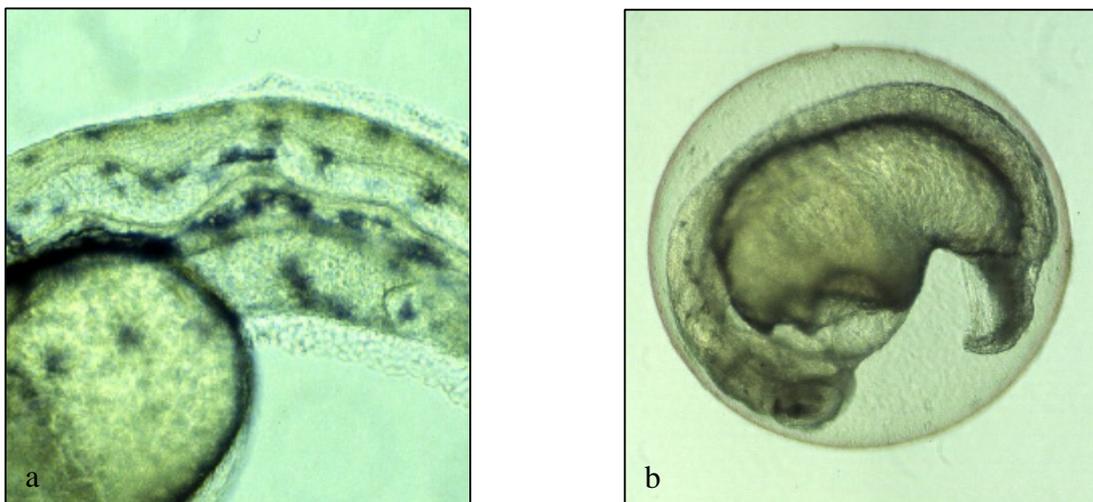


Abb. 3: Chorda- und Schwanzdeformation

a : „zick-zack“-förmige Chordadeformation, 48 h, 0,438 $\mu\text{mol/L}$ Methylquecksilberchlorid (140fache Vergrößerung); b : Schwanz unvollständig abgelöst und deformiert, deformierte Schwanzspitze, Chordadeformation, Otolithen nicht angelegt, keine Pigmentierung, Dotteroedem, 48 h, 123 $\mu\text{mol/L}$ Valproinsäure (55fache Vergrößerung)

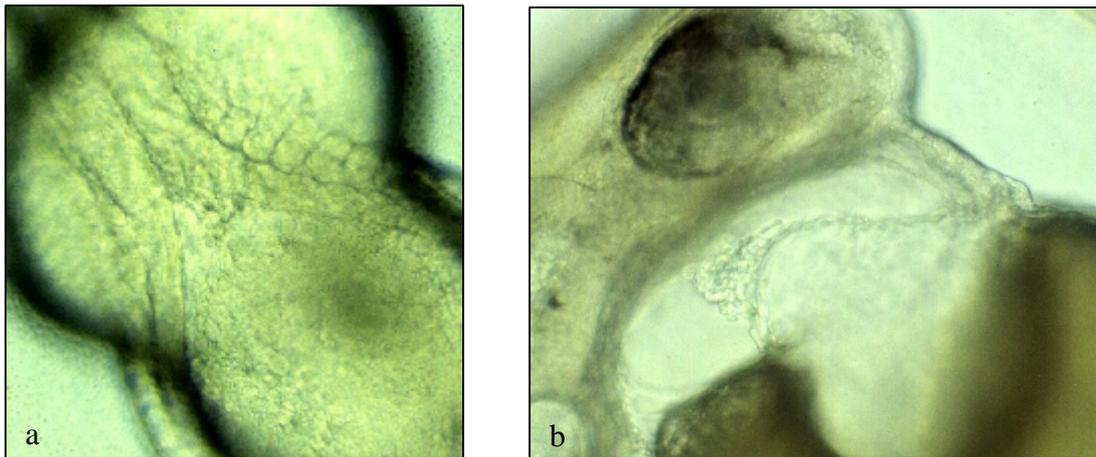


Abb. 4: Spaltembryo und Herzdeformation

a : Spaltembryo, 24 h, 120,2 mmol/L N,N-Dimethylformamid (110fache Vergrößerung);
 b : „schlauchförmig“ deformiertes Herz, 48 h, 123 μ mol/L Valproinsäure (150fache Vergrößerung)

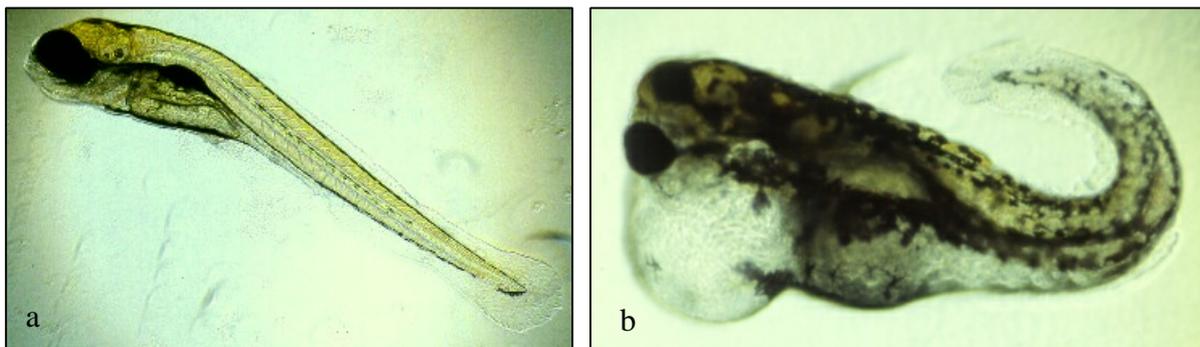


Abb. 5: Larven nach 120 Stunden

a : normal entwickelte Larve, 120 h (20fache Vergrößerung); b : 120 h alte Larve, die als Embryo 48 h in 182,7 mmol/L 1-Methoxy-2-propanol exponiert war: „Säbelschwanz“, Perikardoedem (40fache Vergrößerung)

Koagulierte Embryonen wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt protokolliert.

Nach zweieinhalb Stunden erfolgte die „Befruchtungskontrolle“. Die sich aus den befruchteten Eiern entwickelnden Embryonen haben eine hohe Blastula ausgebildet. Unbefruchtete Eier können eine „blastula-ähnliche“ Gestalt aufweisen, die nicht granulär sondern gelartig-durchsichtig erscheint (Nagel, 1986). Versehentlich exponierte unbefruchtete Eier wurden in die Versuchsauswertung nicht mit einbezogen. Zu diesem Zeitpunkt auftretende Bläschen am Dotter bzw. an den Blastomeren lassen auf starke osmotische Effekte der Testsubstanz schließen.

Nach acht Stunden wurde die Gastrulation kontrolliert. Die Epiboliefront ist gut zu erkennen und die Zellen sollten mehr als die Hälfte des Dotters umwachsen haben. Mit dem Verschluss des Blastoporus ist die Phase der Gastrulation nach zwölf Stunden beendet.

Nach 24 Stunden haben sich die Somitenanlagen unter anderem zu den Myomeren differenziert. Der Stand der Embryonalentwicklung wurde an den Parametern Augenanlage, Entwicklung der Somiten und Ablösung des Schwanzes vom Dotter bestimmt. Mit Hilfe

dieser Endpunkte kann eine abgestufte Entwicklungsverzögerung beschrieben werden. Ist die Entwicklung stark retardiert, hat sich der Schwanz nicht vom Dotter abgelöst. Zum Teil waren keine Somiten angelegt worden und die Augenanlage war nicht zu erkennen. Bei einer weniger starken Retardierung ist die Augenanlage diffus vorhanden. Aufgrund der nach der Anlage der Somiten verlangsamten Entwicklung ist der Schwanz nicht vollständig vom Dotter gelöst (siehe Abb. 2 a und b). Spontanbewegungen sind vorhanden, wenn mindestens ein Schwanzschlag innerhalb von 20 Sekunden stattfindet.

Ab diesem Zeitpunkt wurden ebenfalls Deformationen der Chorda, des Schwanzes und im Bereich des Kopfes erfaßt. Veränderungen des Dotters und Herzdeformationen konnten ebenso erfaßt werden wie die Ausprägung einer Medianspalte. Dieser als „Spaltembryo“ bezeichnete Effekt beruht auf der getrennten Anlage der Längshälften des Körpers im Bereich des Urmundes. Da die Differenzierung der Innenzellen zur Anlage der Achsenorgane und Somiten normal verläuft, kommt es zur Bildung der Anlagen an den Stellen, wo die Vorläuferzellen im Verlaufe einer verzögerten Gastrulation „steckengeblieben“ sind (Baumann & Sander, 1984).

Entwicklung und Funktion des Herz-Kreislaufsystems wurden nach 36 Stunden überprüft. Die Kontraktionen des Herzens sind gut zu erkennen. Sowohl Dotterkreislauf als auch Körperkreislauf müssen vorhanden sein. Die Bewegung der Blutplättchen wurde im Bereich des Dotters und in der Aorta dorsalis kontrolliert.

Vorher geprüfte Endpunkte wurden zu jeder folgenden Beobachtung mit einbezogen. Nach 48 Stunden wurden weiterhin die Pigmentierung und die Ausbildung von Oedemen geprüft. Durch den Druck der sich sammelnden Flüssigkeitsmenge im Gewebe sind diese als eindeutige Verformung des Dotters bzw. als Aufblähung des Perikards zu erkennen. Einige dieser Effekte sind in Abb. 2 bis Abb. 5 (Seite 17 und 18) dargestellt.

Alle bisher genannten Endpunkte sind qualitativer Art und werden im Vergleich mit den Kontrollen einer binären Entscheidung unterzogen. Als ein quantitativer Endpunkt wurde nach 48 Stunden die Herzschlagfrequenz bestimmt. Die Herzschläge wurden 15 Sekunden ausgezählt und auf Schläge pro Minute berechnet.

Beim Vergleich der exponierten Embryonen mit den Kontrollen können folgende Hinweise auf ein reduziertes Längenwachstum überprüft werden:

- verzögert ablaufende Gastrulation (objektiv)
- verzögerte Ablösung des Schwanzes vom Dotter (objektiv)
- Eindruck eines verkürzten Schwanzes (subjektiv)

Lagen einer oder mehrere dieser Hinweise vor, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Testmedium ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Erfahrungsgemäß schlüpfen alle Kontrollembryonen innerhalb von 120 Stunden. Nach dem Schlupf können Körperverkrümmung (Abb. 5b, Seite 18) und Morphologie des Schwanzes sehr gut beurteilt sowie die Schwanzlänge gemessen werden. Bei den Untersuchungen mit Methylquecksilberchlorid (siehe 3.16, Seite 127) wurde das Chorion bereits nach 48 Stunden mechanisch entfernt. Bei den so freipräparierten Embryonen wurde anschließend die Schwanzlänge gemessen. Diese Präparation erforderte einen erheblichen Zeitaufwand. Daher

wurden in den folgenden Testen die Schwanzlängen nach dem natürlichen Schlupf der Embryonen erfaßt.

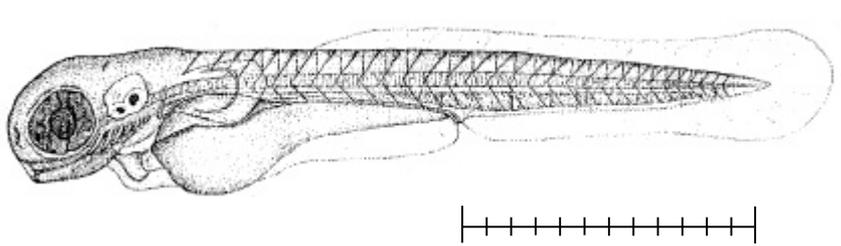


Abb. 6: Darstellung einer 120 h alten Larve

Die Skala gibt den Bereich an, der als Schwanzlänge gemessen wurde.
(25fache Vergrößerung, verändert nach Kimmel et al., 1995)

Die Larven wurden mit MS 222 (0,05 %) betäubt und auf dem Boden der Wells so plaziert, daß sie eben lagen. Der Abstand zwischen Anus und dem posterioren Ende der Chorda wurde als Schwanzlänge definiert (Abb. 6). Um eine durch Substanzen verursachte Wachstumsreduzierung zu erfassen, gingen nur die Larven in die Auswertung ein, die keine Malformationen des Schwanzes oder der Chorda bzw. andere subletale Effekte wie beispielsweise Oedeme aufwiesen.

2.4.9 Testende

Bestand kein Verdacht auf eine Reduktion der Schwanzlänge, wurden die Embryonen nach 48 Stunden mit MS 222 (0,3 %) betäubt und abgetötet. Entsprechend wurde mit den Larven nach 120 Stunden verfahren.

2.4.10 Qualitätskriterien

Ein Test galt als valide, wenn maximal 10 % der Kontrollembryonen Effekte erkennen ließen. Dabei war es unerheblich, ob es sich um letale oder subletale Effekte handelte. Lag der Prozentsatz der Effekte in den Kontrollen über 10 %, wurde der Test wiederholt.

2.5 Datenauswertung und Statistik

LC₅₀ und EC₅₀⁴ wurden mittels Probit-Transformation (Litchfield & Wilcoxon, 1949) aus der Summe der Embryonen berechnet, bei denen entsprechende Effekte beobachtet wurden (qualitative Parameter). Die Genauigkeit der Anpassung wurde mit dem χ^2 -Test ermittelt. Waren die Voraussetzungen für dieses Verfahren nicht erfüllt, wurde die Methode nach Spearman-Kärber bzw. die "Trimmed Spearman-Kärber" Methode verwendet (Lewis et al., 1994). Ergänzt um die Werte LC₁₀ und Steigung b läßt sich der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung abschätzen. Bei einer sehr steilen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung, bei der 0 % und 100 % Effekte in zwei aufeinander folgenden Konzentrationen auftraten, wurde für die Bestimmung von LC₅₀ bzw. EC₅₀ das geometrische Mittel gebildet (Heger et al., 1998).

Herzschlagfrequenz und Schwanzlänge sind quantitative Parameter. Die Verteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die Ermittlung von NOEC- und LOEC⁵-Angaben auf 95 % Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$) erfolgte bei nicht normalverteilten Daten mittels H-Test nach Kruskal-Wallis und Nemenyi-Test als „post hoc“-Verfahren. Lag Normalverteilung und Homogenität der Varianzen vor, wurden NOEC und LOEC auf 95 % Signifikanzniveau mittels Dunnett's-Test ermittelt (Lewis et al., 1994).

2.6 Teratogenitätsindex TI

Zu einer Charakterisierung des teratogenen Potentials von Testsubstanzen kann die Berechnung eines Index beitragen. In Anlehnung an Bantle (1995) wurde in den Fällen, in denen es möglich war, ein Teratogenitätsindex TI ermittelt.

Der Teratogenitätsindex berechnet sich wie folgt: $TI = \frac{LC_{50}}{EC_{50 \text{ teratogen}}}$

Durch den Vergleich der LC₅₀ mit einer Wirkkonzentration, die eine Reduktion des Wachstums wiedergibt, kann auf eine wachstumshemmende Wirkung einer Substanz geschlossen werden. Eine Substanz kann aber auch nur eine Reduktion der Schwanzlänge verursachen, ohne daß qualitativ auswertbare Effekte auftreten. Der Index für die Wachstumsreduzierung TI* wird wie folgt berechnet:

$$TI^* = \frac{LC_{50}}{LOEC_{\text{reduzierte Schwanzlänge}}}$$

⁴ LC₅₀: berechnete Konzentration, bei der bis zu einem bestimmten Zeitpunkt 50 % der untersuchten Embryonen koagulierte. EC₅₀: berechnete Konzentration, bei der zu einem bestimmten Zeitpunkt 50 % der untersuchten Embryonen entsprechende Effekte aufwiesen.

⁵ NOEC: höchste geprüfte Konzentration, bei der keine signifikante Änderung eines quantitativen Parameters im Vergleich zu den Kontrollen auftrat. LOEC: niedrigste geprüfte Konzentration, bei der ein quantitativer Parameter im Vergleich zu den Kontrollen signifikant verändert war.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die im *DarT* erzielten Ergebnisse sind für die jeweiligen Substanzen getrennt dargestellt. Die beobachteten Effekte und die daraus berechneten Werte werden in Tabellen zusammengefaßt. Die Tabellen, in denen letale und subletale Effekte zusammengestellt sind, geben die Anzahl der je Konzentration beobachteten Effekte an (z.B.: 7/18 – sieben von 18 lebenden Embryonen zeigten diesen Effekt). Ein Embryo kann mehrere Effekte aufweisen und wird dementsprechend mehrmals aufgeführt. Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die qualitativen und quantitativen Effekte werden graphisch veranschaulicht. Im Anhang B finden sich die Daten der Somitenpaare, Herzschlagfrequenzen und Schwanzlängen, die bei den einzelnen Substanzen ermittelt wurden. Bei der folgenden Darstellung der Ergebnisse wird nicht explizit darauf verwiesen. Die Befunde aus säugertoxikologischen Untersuchungen hinsichtlich der Teratogenität der Substanzen werden anschließend an die im *DarT* erzielten Befunde dargestellt. Bei den zu Gruppen zusammengefaßten Substanzen (z.B. Retinoide, Valproinsäure und Analoga) werden die Befunde am Ende eines Abschnittes zusammenfassend dargestellt.

Für die Testdaten wurde mittels Probit-Transformation eine Regressionsgerade errechnet, aus der die Wirkkonzentrationen EC_{50} und LC_{50} bestimmt wurden. Die Genauigkeit der Anpassung wurde mit dem χ^2 -Test ermittelt. Für diese mittels Probit-Transformation berechneten Wirkkonzentrationen wurde χ^2 gehalten, ohne das im Text darauf verwiesen wird. Ergänzt um die Werte EC_{10} (bzw. LC_{10}) und Steigung b läßt sich der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung abschätzen. Konnte aufgrund der Datenlage die Probit-Transformation nicht angewendet werden, wurde die Berechnung mittels "Spearman-Kärber"- bzw. "Trimmed Spearman-Kärber"-Methode durchgeführt. Im Text wird darauf verwiesen. Angaben zu EC_{10} bzw. LC_{10} und zur Steigung b konnten bei den beiden letztgenannten Methoden nicht gemacht werden.

Die Untersuchungen zu Aceton und Ethanol wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Sabine Richter geb. Maiwald durchgeführt (Maiwald, 1997).

In der vorliegenden Arbeit werden den Bezeichnungen „Ratte“, „Maus“, „Kaninchen“, „Katze“ und „Hamster“ keine Artnamen nachgestellt. Bei der Ratte handelt es sich um verschiedene Zuchtstämme der Laborratte, die aus der Wildform der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) gezüchtet wurde. Die Bezeichnung Maus umfaßt eine Vielzahl von Zuchtstämmen, die von der Hausmaus (*Mus musculus domesticus*) abstammen. Unter Kaninchen wird meist das aus dem Europäischen Wild-Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) gezüchtete „Versuchskaninchen“ verstanden, von dem es zahlreiche verschiedenen Rassen gibt. In toxikologischen Untersuchungen werden weiterhin die Hauskatze (*Felis silvestris catus*) sowie der Syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*), Chinesische Hamster (*Cricetulus griseus*) bzw. Dschungarische Hamster (*Phodopus sungorus*) eingesetzt.

3.1 Aceton

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde Aceton in folgenden Konzentrationen untersucht: 111,9; 134,3; 161,8; 192,8 und 232,4 mmol/L. Die Sauerstoffsättigung des Kontrollmediums und der Testlösungen lag über 90 % und die pH-Werte zwischen 6,5 und 7,5. Für die Osmolarität wurden Werte zwischen 110 und 227 mOsmol/L bestimmt (siehe Tab. A 2 , Anhang A). Der Test ist valide, da die Kontrollembryonen keine Effekte aufwiesen (siehe Tab. 6 und Tab. 7).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 6 zusammengestellt. In der höchsten Konzentration fanden sich bereits nach acht Stunden abgestorbene Embryonen (20 %), deren Zahl sich mit zunehmender Expositionsdauer erhöhte. Nach 48 Stunden wurde für die LC₅₀ ein Wert von 225,4 mmol/L berechnet ($R^2 = 0,766$; $b = 13,9$; LC₁₀ = 182,4 mmol/L).

Tab. 6: Zusammenstellung der letalen Effekte von Aceton

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	111,9	134,3	161,8	192,8	232,4
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	4
	12	–	–	–	1	1	6
	24	–	–	–	1	1	9
	36	–	–	–	1	1	10
	48	–	–	–	1	1	14

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die durch Aceton verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 7 aufgeführt. Bereits 2,5 Stunden nach Beginn der Exposition traten in allen Konzentrationen (außer 111,9 mmol/L) Embryonen auf, die Bläschen am Dotter bzw. an den Blastomeren abgeschnürt hatten. Die Effekte deuteten auf eine osmotische Wirkung der Substanz hin. Die Osmolarität lag über dem von Lange et al. (1995) angegebenen Grenzwert von 100 mOsmol/L, oberhalb dessen osmotische Effekte an den Embryonen von *D. rerio* zu erwarten sind. Werden diese Effekte mit der Fehlentwicklung der frühen Furchungsstadien („keine hohe Blastula“) zusammengefaßt, läßt sich eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung erkennen. Die EC₅₀ (2,5 h) für diese frühe Störung der Ontogenese beträgt 237,2 mmol/L ($R^2 = 0,760$; $b = 5,9$; EC₁₀ = 143,6 mmol/L). Jeweils einer dieser Embryonen in 161,8 und 192,8 mmol/L hatte nach acht Stunden noch nicht mit der Epibolie begonnen und koagulierte innerhalb der folgenden vier Stunden. Zu diesem Zeitpunkt (nach zwölf Stunden) wurde je Konzentration bei 90 bis 100 % der Embryonen eine Verzögerung der Epibolie festgestellt („Gastrulation nicht beendet“). Bis zum Meßzeitpunkt nach 24 Stunden hatten alle lebenden Embryonen die Gastrulation abgeschlossen. Nach 24 Stunden ließen Embryonen vermehrt keine Spontanbewegung erkennen. In 134,3 mmol/L betraf das 25 %, in 161,8 mmol/L 84,2 % und ab 192,8 mmol/L alle Embryonen. Betrachtet man die Endpunkte „Schwanz unvollständig abgelöst“, Schwanz nicht abgelöst“ und „diffuse bzw. keine Augenanlage“, wird nach 24 Stunden eine Entwicklungsverzögerung deutlich. Die EC₅₀ Entwicklungsverzögerung (24 h) beträgt 141,4 mmol/L

($R^2 = 0,941$; $b = 11,5$; $EC_{10} = 109,5$ mmol/L). Eine Störung des Herz-Kreislaufsystems war sowohl nach 36 als auch nach 48 Stunden zu erkennen. Für die verzögerte Ausbildung des Herz-Kreislaufsystems nach 36 Stunden wurde eine EC_{50} von 85,9 mmol/L ($b = 4,8$; $EC_{10} = 46,4$ mmol/L) berechnet. Für den fehlenden Blutkreislauf nach 48 Stunden beträgt die EC_{50} 137,8 mmol/L ($R^2 = 0,889$; $b = 11,8$; $EC_{10} = 107,3$ mmol/L).

Auf eine Störung des Herz-Kreislaufsystems nach 48 Stunden weist ebenfalls die ab 161,8 mmol/L signifikant reduzierte ($p = 0,05$) Herzschlagfrequenz hin (Abb. 7, Seite 26). Bereits der Median der geringsten Konzentration ist gegenüber dem der Kontrolle verringert. Obwohl die Werte der exponierten Embryonen deutlich stärker streuen als die der Kontrollen, ist die konzentrationsabhängige Reduktion der Herzschlagfrequenz zu erkennen.

Ein Einfluß auf die Pigmentierung wurde in 161,8 mmol/L bei 10,5 % , in 192,8 mmol/L bei 89,5 % und in 232,4 mmol/L bei 50 % der Embryonen festgestellt. In allen Konzentrationen traten vermehrt Oedeme auf. Die EC_{50} Oedeme (48 h) beträgt 135,4 mmol/L ($R^2 = 0,978$; $b = 7,5$; $EC_{10} = 91,4$ mmol/L). Für die Summe aller subletalen Endpunkte läßt sich eine EC_{50} subletal (48 h) von 125,5 mmol/L angeben ($R^2 = 0,855$; $b = 9,8$; $EC_{10} = 93,0$ mmol/L).

Tab. 7: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Aceton auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	111,9	134,3	161,8	192,8	232,4
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	4	2	4
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	1	6	4	7
	8	–	–	–	6	4	6/16
	12	–	–	–	4/19	4/19	4/14
keine Gastrulation	8	–	–	–	1	1	–
Gastrulation nicht beendet	12	–	18	19	19/19	19/19 ^a	14/14 ^b
keine Spontanbewegung	24	–	–	5	16/19	19/19	11/11
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	–	4/19	7/11
	36	–	–	–	–	–	7/10
	48	–	–	–	–	–	3/6
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	3	6	14/19	4/19	–
	36	–	–	–	–	1/19	–
	48	–	–	–	–	–	–
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	1/19	2/19	5/11
	36	–	–	–	–	1/19	1/10
	48	–	–	–	–	–	1/6
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	1/10
	48	–	–	–	–	–	–

Tab. 7 Fortsetzung

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	111,9	134,3	161,8	192,8	232,4
keine Augenanlage	24	–	–	1	1/19	7/19	11/11
	36	–	–	–	1/19	–	7/10
	48	–	–	–	–	–	2/6
kein Herzschlag	36	–	–	–	–	14/19	9/10
	48	–	–	–	1/19	4/19	4/6
schwacher Blutkreislauf	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	1	–	–	–	–
kein Blutkreislauf	36	–	15	16	16/19	19/19	9/10
	48	–	4	5	17/19	18/19	6/6
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	1/19	15/19	2/6
keine Pigmentierung	48	–	–	–	1/19	2/19	1/6
Dotteroedem	48	–	3	5	7/19	14/19	3/6
Perikardoedem	48	–	3	4	6/19	3/19	1/6
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	1/19	6/19	–
	36	–	–	–	1/19	2/19	–
	48	–	–	–	1/19	1/19	–
keine Kopfanlage	24	–	–	–	–	6/19	10/11
	36	–	–	–	–	1/19	7/10
	48	–	–	–	–	1/19	4/6
Kopfdeformation	24	–	–	–	–	–	1/11
	36	–	–	–	–	–	1/10
	48	–	–	–	–	–	–
Schwanzdeformation	24	–	–	–	2/19	10/19	9/1
	36	–	–	–	3/19	13/19	7/10
	48	–	–	–	3/19	14/19	6/6
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	1/19	–	–
	48	–	–	–	1/19	–	–
Spaltembryo	24	–	–	–	–	8/19	5/11
	36	–	–	–	–	–	1/10
	48	–	–	–	–	–	1/6
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	2/19	–	1/6
Σ teratogen		0	0	0	4/19	14/19	6/6
Σ subletal		0	7	9	18/19	18/19	6/6

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : bei 9 Embryonen Gastrulation erst in Anfangsstadium; b : bei 13 Embryonen Gastrulation erst in Anfangsstadium

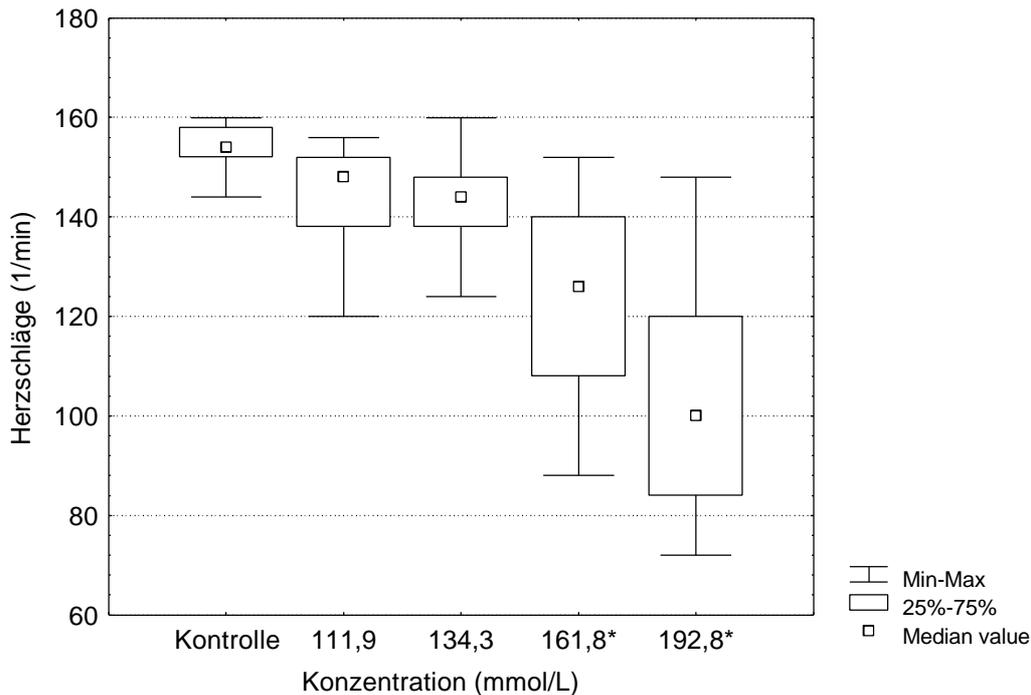


Abb. 7: Wirkung von Aceton auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC_{reduzierte Herzschlagfrequenz}: 134,3 / 161,8 mmol/L

Teratogene Effekte wurden ab 161,8 mmol/L verursacht. Deformationen der Chorda, des Schwanzes bzw. der Schwanzspitze traten ebenso auf wie eine fehlende Kopfanlage. Nach 24 Stunden wurde bei 31,6 % der Embryonen in 192,8 mmol/L eine Deformation der Chorda beobachtet; ein Effekt, der nach 48 Stunden nur noch bei 5,3 % der Embryonen auftrat. Bei den Embryonen, die nach 24 Stunden noch keine Kopfanlage ausgebildet hatten, wurde diese in der weiteren Entwicklung angelegt. Ein Embryo, der nach 24 und 36 Stunden eine Kopfdeformation aufwies, war bis zum Meßzeitpunkt nach 48 Stunden abgestorben. Die Anzahl der in den beiden höchsten Konzentrationen nach 24 Stunden beobachteten Spaltembryonen (42,1 bzw. 45,5 %) reduzierte sich, so daß bei Testende nur noch in der höchsten Konzentration ein (16,7 %) Spaltembryo auftrat. Nach Sander & Baumann (1983) können die dorsal getrennten Längshälften des Körpers in der weiteren Entwicklung zusammengezogen werden, ohne miteinander zu verwachsen. Die offene Medianspalte ist dann als solche nicht mehr zu erkennen.

In 161,8 und 232,4 mmol/L entwickelten zwei (10,5 %) bzw. einer (16,7 %) der lebenden Embryonen keine Sacculi. Für die EC_{50} teratogen (48 h) wurde ein Wert von 177,2 mmol/L errechnet ($R^2 = 0,986$; $b = 30,1$; $EC_{10} = 160,7$ mmol/L). Die Wirkung von Aceton auf das Längenwachstum wurde nicht untersucht. In Tab. 8 sind die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC / LOEC zusammengestellt, Abb. 8 zeigt den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für teratogene und letale Effekte.

Tab. 8: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Aceton

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	225,4 (208,6 – 243,6)
EC ₅₀ frühe Ontogenese	2,5	237,2 (194,7 – 289,1)
EC ₅₀ Entwicklungsverzögerung	24	141,4 (131,4 – 152,2)
EC ₅₀ Herz-Kreislauf	36	85,9 (1,8 – 110,6)
EC ₅₀ Blutkreislauf	48	137,8 (129,0 – 147,2)
EC ₅₀ Oedeme	48	135,4 (123,0 – 149,2)
EC ₅₀ subletal	48	125,5 (115,2 – 136,7)
EC ₅₀ teratogen	48	177,2 (170,5 – 184,3)
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	134,3 / 161,8
TI		1,27

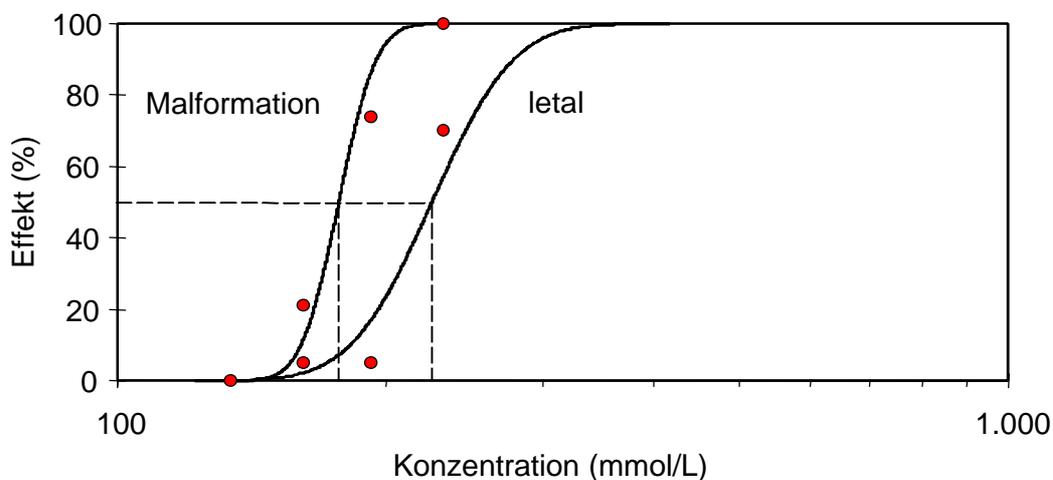


Abb. 8: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Aceton für die teratogenen und die letalen Effekte

LC₅₀ (48 h): 225,4 mmol/L; EC₅₀ teratogen (48 h): 177,2 mmol/L

Letale und teratogene Effekte traten in einem engen Konzentrationsfenster auf. Im mittleren Bereich sind beide Sigmoiden deutlich voneinander getrennt. Die Sigmoiden für die letalen Effekte steigt flacher an ($b = 13,9$) als die der teratogenen Effekte ($b = 30,1$). Beide Kurve entspringen einem gemeinsamen Bereich der Abszisse, spreizen sich aber in ihrem weiteren Verlauf auf. Als Quotient aus LC₅₀ und EC₅₀ teratogen ergibt sich ein Teratogenitätsindex TI von 1,27. Teratogene Effekte wurden in Konzentrationen beobachtet, in denen auch letale Effekte verursacht wurden. In 161,8 und 192,8 mmol/L traten jedoch nur 5 % letale Effekte auf, während 21,1 bzw. 73,7 % zum Teil massive teratogene Effekte verursacht wurden. Bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* zeigte sich für Aceton ein teratogenes Potential.

In der Literatur sind keine Untersuchungen mit Säugetieren bekannt, die für Aceton ein teratogenes Potential belegen würden (Mast et al., 1988; Pereira et al., 1987 – zitiert nach BUA 170, 1996). Bei Maus und Ratte zeigten sich nach inhalativer Exposition von nicht maternaltoxischen Konzentrationen keine embryotoxischen oder teratogenen Wirkungen (Weiss, 1980 zitiert nach: Rippen, 1990). *DarT* liefert für Aceton ein falsch positives Ergebnis.

3.2 Blei(II)-acetat-Trihydrat

Untersucht wurden die Konzentrationen: 0,1; 0,3; 1,6; 7,9 und 39,5 mmol/L. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich (siehe Tab. A 4, Anhang A). Die Osmolarität wurde nicht bestimmt. Bereits nach 2,5 Stunden war in allen Konzentrationen eine unbestimmte Substanzmenge ausgefallen. Da es sich bei dem Testmedium nicht um destilliertes Wasser handelt (siehe 2.4.4, Seite 14), können sich unlösliche Bleisalze gebildet haben. Vermutlich handelte es sich bei den ausgefallenen Bestandteilen um Blei(II)-carbonat (PbCO_3). Die Konzentrationsangaben sind somit fragwürdig, und eine quantitative Auswertung kann nicht erfolgen. Die Effekte können nur qualitativ betrachtet werden. Die Konzentrationen wurden von 1 bis 5 durchnummeriert.

Die Kontrollembryonen wiesen weder letale noch subletale Effekte auf (siehe Tab. 9 und Tab. 10). Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 9 aufgeführt. Obwohl nur eine qualitative Betrachtung möglich ist, nehmen die letalen Effekte nach 24 und 48 Stunden „konzentrationsabhängig“ zu.

Tab. 9: Zusammenstellung der letalen Effekte von Blei(II)-acetat-Trihydrat (qualitative Betrachtung)

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ^a					
		Kontrolle	1	2	3	4	5
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	3	4	20	20
	48	–	–	3	17	20	20

Pro „Konzentration“ wurden 20 Embryonen exponiert. a : da Substanz ausfiel, ist keine quantitative Auswertung möglich; – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die durch Blei(II)-acetat-Trihydrat verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 10 zusammengestellt. Nach 2,5 Stunden traten vermehrt Bläschen an den Blastomeren auf. Vermutlich handelt es sich dabei um osmotische Effekte. Die Osmolarität wurde allerdings nicht bestimmt. In der zweiten und dritten Konzentration hatte jeweils ein Embryo (5,9 bzw. 33,3 % nach 48 h) keine Somiten angelegt. Diese beiden wiesen nachfolgend eine Reihe von Mißbildungen auf: z.B. ein nicht abgelöster Schwanz, gestörte Entwicklung des Kopfes inkl. fehlenden Augen und Sacculi. Eine Deformation der Chorda wurde bei zwei weiteren Embryonen der zweiten Konzentration beobachtet.

Eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems wurde nach 48 Stunden bei jeweils zwei Embryonen der zweiten (11,8 %) und dritten Konzentration (66,7 %) deutlich. Oedeme wurden in der ersten und zweiten Konzentration beobachtet.

Tab. 10: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Blei(II)-acetat-Trihydrat (qualitative Betrachtung)

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ^a					
		Kontrolle	1	2	3	4	5
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	2	5	1	4	8
keine Spontanbewegung	24	–	–	1/17	1/16	†	†
Somiten nicht angelegt	24	–	–	1/17	1/16	†	†
	48	–	–	1/17	1/3	†	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	1/17	1/16	†	†
	48	–	–	1/17	1/3	†	†
keine Augenanlage	24	–	–	1/17	1/16	†	†
	48	–	–	1/17	1/3	†	†
kein Herzschlag	48	–	–	–	2/3	†	†
kein Blutkreislauf	48	–	–	2/17	2/3	†	†
Dotterödem	48	–	–	3/17	–	†	†
Perikardödem	48	–	1	1/17	–	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	2/17	–	†	†
	48	–	–	2/17	–	†	†
keine Kopfanlage	24	–	–	1/17	–	†	†
	48	–	–	1/17	–	†	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	†	†
	48	–	–	1/17	–	†	†
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	1/17	1/3	†	†
Σ teratogen		0	0	3/17	1/3	†	†
Σ subletal		0	1	5/17	2/3	†	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. a : da Substanz ausfiel ist keine quantitative Auswertung möglich; – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koagulierte; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Obwohl keine quantitative Auswertung möglich ist, kann eingeschätzt werden, daß Blei(II)-acetat-Trihydrat im *DarT* ein gewisses teratogenes Potential zeigt. Allerdings wurden die teratogenen Effekte in einem Konzentrationsbereich beobachtet, in dem letale Effekte auftraten bzw. sogar überwogen.

Blei(II)-acetat-Trihydrat ist ein Beispiel für eine Substanz, die nicht ohne Probleme zu untersuchen ist. Die geringe Wasserlöslichkeit, bzw. das Ausfallen schwerlöslicher Salze, schränkt die Möglichkeiten, solche Substanzen zu testen, ein. Dennoch ist eine qualitative Betrachtung möglich, um das teratogene Potential der Substanz abzuschätzen.

3.3 Colcemid

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurden die Konzentrationen 3,2; 5,4; 9,2; 15,6 und 26,7 $\mu\text{mol/L}$ untersucht. Sauerstoffsättigung und pH-Werte lagen sowohl im Kontrollmedium als auch in den Testlösungen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Werte sind in Tab. A 6 (Anhang A) zusammengestellt. Die Osmolarität der einzelnen Konzentrationen wurde nicht ermittelt. Der Test ist valide, da bei nicht mehr als 5 % der Kontrollembryonen letale und subletale Effekte auftraten (siehe Tab. 11 und Tab. 12).

In Tab. 11 sind die letalen Effekte von Colcemid zusammengestellt. Bereits nach 24 Stunden waren in den beiden höchsten Konzentrationen alle und in 9,2 $\mu\text{mol/L}$ neun Embryonen (45 %) koaguliert. Bis zum Meßzeitpunkt nach 48 Stunden starben keine weiteren Embryonen. Die LC_{50} (48 h) beträgt 9,2 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,9997$; $b = 16,1$; $\text{LC}_{10} = 7,7 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 11: Zusammenstellung der letalen Effekte von Colcemid

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	3,2	5,4	9,2	15,6	26,7
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	9	20	20
	48	–	–	–	9	20	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Tab. 12 faßt die durch Colcemid verursachten subletalen Effekte zusammen. Bereits nach 2,5 Stunden war die Embryonalentwicklung gestört. Verursacht durch die zytostatische Wirkung von Colcemid kam es zur Hemmung der frühen Zellteilungen. Die Phase der hohen Blastula wurde von einem Embryo (5 %) in 9,2 $\mu\text{mol/L}$, von sieben Embryonen (35 %) in 15,6 $\mu\text{mol/L}$ und von 16 Embryonen (80 %) in 26,7 $\mu\text{mol/L}$ nicht erreicht. Für diese frühe Störung der Ontogenese errechnet sich eine EC_{50} (2,5 h) von 18,5 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,9999$; $b = 5,4$; $\text{EC}_{10} = 10,7 \mu\text{mol/L}$). Im Laufe der folgenden 20 Stunden koagulierten alle diese Embryonen.

Weitere subletale Effekte konnten nur in geringem Ausmaß beobachtet werden. In 9,2 $\mu\text{mol/L}$ hatte ein Embryo (9,1 %) nach 24 und 48 Stunden den Schwanz nicht vom Dotter abgelöst und keine Augen entwickelt. Zwei Embryonen (18,2 %) bildeten ihre Augen verzögert aus. Eine Beeinträchtigung des Blutkreislaufes und die Ausprägung von Oedemen wurde nach 48 Stunden bei fünf Embryonen (45,5 %) in dieser Konzentration festgestellt. Diese Effekte traten ebenfalls bei je einem Embryo (5 %) der Kontrolle und der niedrigsten Konzentration auf. Aufgrund der Datenlage ließ sich für die Summe der subletalen Effekte keine EC_{50} berechnen. In 9,2 $\mu\text{mol/L}$ wiesen nach 48 Stunden 45,5 % der Embryonen subletale Effekte auf.

Teratogene Effekte wurden bei vier Embryonen (36,4 %) in 9,2 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet, die Deformationen des Schwanzes bzw. der Schwanzspitze aufwiesen. Auch in diesem Fall ließ sich keine EC_{50} berechnen.

Tab. 12: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Colcemid auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	3,2	5,4	9,2	15,6	26,7
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	1	7	16
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	1/11	†	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	1/11	†	†
	48	–	–	–	1/11	†	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	2/11	†	†
	48	–	–	–	–	†	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	1/11	†	†
	48	–	–	–	1/11	†	†
schwacher Blutkreislauf	48	–	1	–	1/11	†	†
kein Blutkreislauf	48	1	–	–	3/11	†	†
Dotterödem	48	1	1	–	5/11	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Schwanzdeformation	24	–	–	–	3/11	†	†
	48	–	–	–	3/11	†	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	1/11	†	†
	48	–	–	–	2/11	†	†
Σ teratogen		0	0	0	4/11	†	†
Σ subletal		1	1	0	5/11	†	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Um eine mögliche Wirkung von Colcemid auf das Längenwachstum zu erfassen, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Die beobachteten Effekte sind in Tab. 13 aufgeführt.

In $9,2 \mu\text{mol/L}$ war ein Embryo nicht geschlüpft und abgestorben. Die LC_{50} (120 h) beträgt $9,2 \mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 1,000$; $b = 16,1$; $LC_{10} = 7,6 \mu\text{mol/L}$) und entspricht der LC_{50} (48 h).

Die drei Embryonen in $9,2 \mu\text{mol/L}$, die nach 48 Stunden eine Schwanzdeformation aufwiesen, waren geschlüpft und zeigten auch als Larven diese Deformationen. Bei einer vierten Larve wurde eine leichte Chordadeformation im Bereich des Schwanzes beobachtet. Insgesamt hatten 40 % der lebenden Larven dieser Konzentration teratogene Effekte. Eine $EC_{50 \text{ teratogen}}$ ließ sich auch zu diesem Zeitpunkt nicht berechnen. Eine Larve der Kontrolle (5 %) wies einen dorsal gebogenen Schwanz (Säbelschwanz) sowie Dotter- und Perikardödem auf.

Tab. 13: Zusammenstellung der Effekte von Colcemid auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 h

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	3,2	5,4	9,2	15,6	26,7
koaguliert	120	–	–	–	10 ^a	20	20
Dotterödem	120	1	–	–	1/10	†	†
Perikardoedem	120	1	–	–	1/10	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	120	–	–	–	1/10	†	†
Schwanzdeformation	120	–	–	–	3/10	†	†
Säbelschwanz	120	1	–	–	–	†	†
Σ teratogen		1	0	0	4/10	†	†
Σ subletal		1	0	0	4/10	†	†

Anzahl der Larven je „Konzentration“ n = 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : ein Embryo nicht geschlüpft

In Abb. 9 sind die Schwanzlängen der Larven in den verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Es läßt sich eine Reduktion der Schwanzlänge bei 9,2 $\mu\text{mol/L}$ erkennen, die jedoch nicht signifikant ist ($p = 0,05$). Aus dieser Konzentration gingen zudem nur sechs Larven in die Auswertung ein. In Tab. 14 sind die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC / LOEC zusammengestellt.

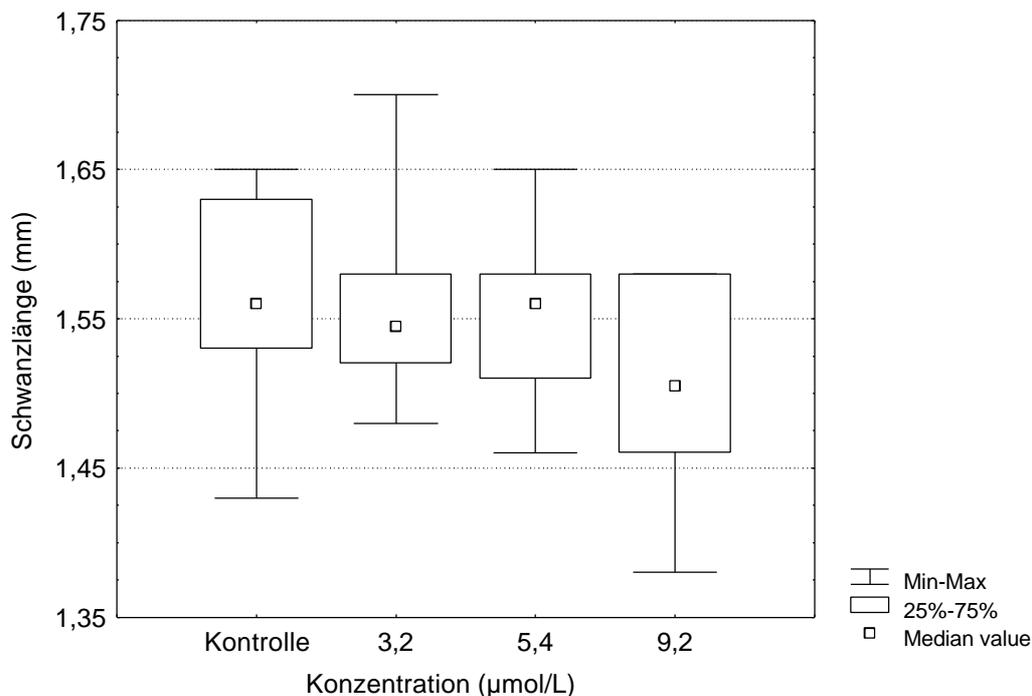


Abb. 9: Wirkung von Colcemid auf die Längenentwicklung des Schwanzes

Tab. 14: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Colcemid

	Zeit (h)	$\mu\text{mol/L}$
LC ₅₀	48	9,2 (8,5 – 10,0)
LC ₅₀	120	9,2 (8,5 – 9,9)
EC ₅₀ hohe Blastula	2,5	18,5 (15,7 – 21,8)
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	9,2 / –

In der Konzentration 9,2 $\mu\text{mol/L}$ wurden bei 36,4 % der lebenden Embryonen teratogene Effekte beobachtet, wobei die letalen Effekte bereits überwogen. Aufgrund der Datenlage konnte für die teratogenen Effekte kein Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung in Form einer Sigmoide erstellt werden.

Um zu veranschaulichen, daß die teratogenen von den letalen Effekten überdeckt werden, kann der in Abb. 10 dargestellte hypothetische Kurvenverlauf angenommen werden. Dazu unterstellt man für teratogene und letale Effekte einen vergleichbaren Kurvenverlauf und vernachlässigt die Tatsache, daß für die teratogenen Effekte eine Extrapolation nicht zulässig ist.

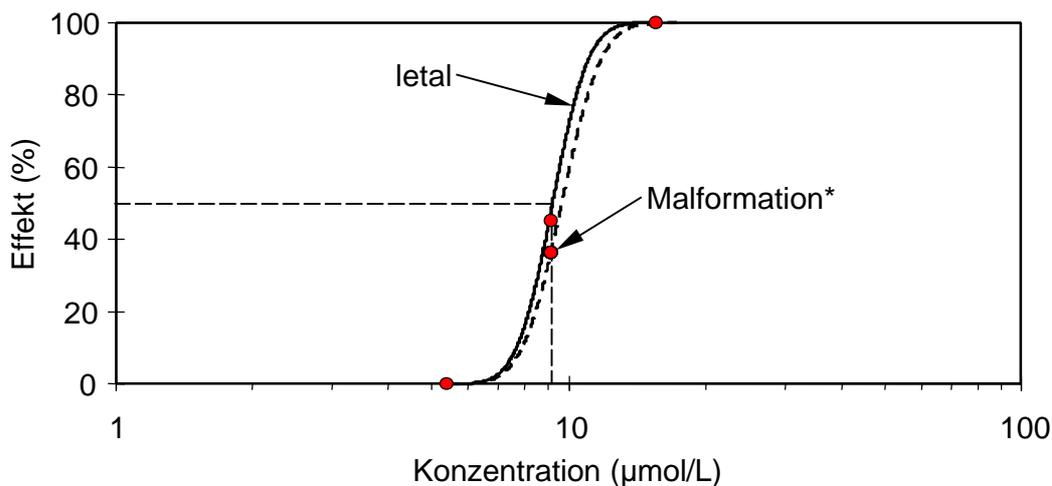


Abb. 10: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Colcemid für die letalen und teratogenen* Effekte

LC₅₀ (48 h): 9,2 $\mu\text{mol/L}$; * : hypothetischer Kurvenverlauf

Es wird deutlich, daß die teratogenen von den letalen Effekten überdeckt werden. Colcemid ließ bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* kein eindeutiges teratogenes Potential erkennen und spiegelt damit die Verhältnisse beim Säuger wider.

In der Literatur finden sich zum säugerteratogenen Potential von Colcemid zum Teil widersprüchliche Angaben. 1,5 bis 7,5 mg Colcemid wurde Frauen in der frühen Schwangerschaft als Chemotherapeutikum verabreicht. Die Neugeborenen wiesen keine Anomalien auf (Sokal & Lessmann, 1960). Nach Shepard (1992) bewirkt Colcemid bei Kaninchen und Affen embryonale Effekte, ohne Malformationen in höherem Ausmaß zu verursachen. Bei Mäusen wurde die Trächtigkeit vorzeitig unterbrochen. Beim Kaninchen lösten 0,1 bis 0,5 mg/kg ein

vermehrtes Auftreten von Neuralrohrdefekten aus, während 2 bis 8 mg/kg bereits eine Degeneration von Blastocysten verursachte (Shepard, 1992).

3.4 Cycloheximid

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurden folgende Konzentrationen untersucht: 1,8; 3,6; 7,1; 14,2 und 28,4 $\mu\text{mol/L}$. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Werte sind in Tab. A 7 (Anhang A) zusammengestellt.

Der Test ist valide, da bei den Kontrollembryonen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 15 und Tab. 16). In Tab. 15 sind die letalen Effekte von Cycloheximid zusammengestellt. Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden läßt sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der letalen Effekte erkennen. In 3,6 $\mu\text{mol/L}$ traten nach 48 Stunden drei (15 %) und in 7,1 $\mu\text{mol/L}$ 15 koagulierte Embryonen (75 %) auf. In den beiden höchsten Konzentrationen waren zu diesem Zeitpunkt alle Embryonen abgestorben. Die LC_{50} (48 h) beträgt 5,2 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,990$; $b = 8,0$; $\text{LC}_{10} = 3,6 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 15: Zusammenstellung der letalen Effekte von Cycloheximid

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	1,8	3,6	7,1	14,2	28,4
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	9	19	20
	48	–	–	3	15	20	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 16 sind die durch Cycloheximid verursachten subletalen Effekte zusammengefaßt. Die ersten Effekte traten nach 24 Stunden auf. Auffällig war der Entwicklungsstop bei verschiedenen Embryonen, nachdem die Gastrulation beendet und der Blastoporus verschlossen war. In 3,6 $\mu\text{mol/L}$ legten vier Embryonen (20 %), in 7,1 $\mu\text{mol/L}$ acht Embryonen (72,7 %) und in 14,2 $\mu\text{mol/L}$ der einzige lebende Embryo keine Organe an. Die EC_{50} (24 h) für diesen frühen Entwicklungsstop beträgt 5,1 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,983$; $b = 7,9$; $\text{EC}_{10} = 3,5 \mu\text{mol/L}$). Die meisten dieser Embryonen starben während der folgenden 24 Stunden. Nach 48 Stunden lebten in 3,6 $\mu\text{mol/L}$ noch zwei (11,8 %) und in 7,1 $\mu\text{mol/L}$ noch drei (60 %) dieser Embryonen. Sie waren vollkommen undifferenziert und ließen keine Organanlagen erkennen (Abb. 11 a). Für den Endpunkt „keine Spontanbewegung“ ergab sich nach 24 Stunden von 1,8 bis 7,1 $\mu\text{mol/L}$ eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Der einzige lebende Embryo in 14,2 $\mu\text{mol/L}$ ließ Bewegungsaktivität erkennen. Einzelne Embryonen hatten bis zu diesem Zeitpunkt keine Somiten angelegt, und starben in den folgenden 24 Stunden ab. Betrachtet man die Schwanzablösung vom Dotter und die Entwicklung der Augen, wird nach 24 Stunden eine verzögerte Embryonalentwicklung deutlich. In 1,8 $\mu\text{mol/L}$ waren vier Embryonen (20 %) davon betroffen, in 3,6 $\mu\text{mol/L}$ 13 Embryonen (81,3 %) und in 7,1 $\mu\text{mol/L}$ alle Embryonen, die nicht schon vorher die Entwicklung vollkommen eingestellt

hatten. Für die Entwicklungsverzögerung nach 24 Stunden wurde eine EC_{50} von $2,4 \mu\text{mol/L}$ berechnet ($R^2 = 0,981$; $b = 7,6$; $EC_{10} = 1,6 \mu\text{mol/L}$).

Cycloheximid bewirkt also zum einen den Stop der frühen Embryonalentwicklung nach 24 Stunden, in dessen Folge die Embryonen abstarben bzw. undifferenziert blieben. Zum anderen wurden die sich anschließenden Entwicklungsphasen verzögert, was vor allem die Ablösung des Schwanzes vom Dotter und die Augenentwicklung betraf. Die Embryonen zeigten bei diesen Endpunkten eine empfindlichere Reaktion (EC_{50} Entwicklungsverzögerung (24 h) = $2,4 \mu\text{mol/L}$) als beim Stop der frühen Embryonalentwicklung. Die EC_{50} Entwicklungsstop (24 h) liegt mit $5,1 \mu\text{mol/L}$ im Bereich der LC_{50} nach 48 h. Das deutet darauf hin, daß eine Reihe dieser Embryonen bis nach 48 Stunden koagulierten.

Nach 48 Stunden war der Blutkreislauf konzentrationsabhängig beeinträchtigt, und es traten vermehrt Dotterödeme auf. Die EC_{50} Herz-Kreislauf (48 h) beträgt $3,5 \mu\text{mol/L}$ ($b = 3,7$; $EC_{10} = 1,6 \mu\text{mol/L}$). In $3,6 \mu\text{mol/L}$ wiesen alle 15 lebenden Embryonen eine im Vergleich zu den Kontrollen stark verringerte Pigmentierung auf. In $7,1 \mu\text{mol/L}$ hatten die beiden nicht vollkommen undifferenzierten Embryonen keine Melanocyten ausgebildet. Aus der Summe der subletalen Effekte nach 48 Stunden berechnete sich eine EC_{50} subletal von $3,2 \mu\text{mol/L}$ ($b = 4,4$; $EC_{10} = 1,6 \mu\text{mol/L}$).

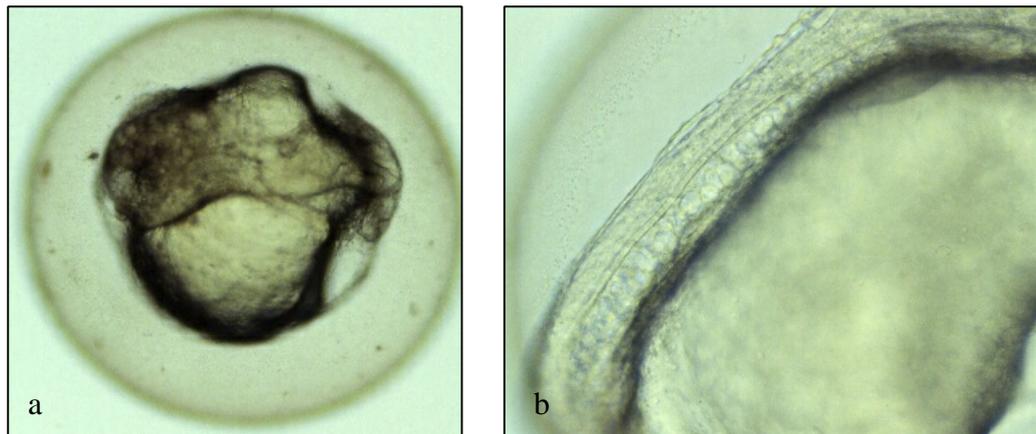


Abb. 11: Beispiele für Effekte an Cycloheximid-exponierten Embryonen

- a : nach Gastrulation nicht weiterentwickelter Embryo, 48 h, $7,1 \mu\text{mol/L}$ (55fache Vergrößerung);
 b : veränderte Chordastruktur im Bereich des Körpers, 48 h, $7,1 \mu\text{mol/L}$ (100fache Vergrößerung)

Tab. 16: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Cycloheximid auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	1,8	3,6	7,1	14,2	28,4
nach Gastrulation nicht weiterentwickelt	24	–	–	4	8/11	1/1	†
	48	–	–	2/17	3/5	†	†
keine Spontanbewegung	24	–	4	14	3/3	–	†
Somiten nicht angelegt	24	–	–	1	1/3	1/1	†
	48	–	–	–	–	†	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	1	7	–	–	†
	48	–	–	–	–	†	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	2	6	3/3	–	†
	48	–	–	1/17	1/2	†	†
diffuse Augenanlage	24	–	4	8	–	–	†
	48	–	–	–	2/2	†	†
keine Augenanlage	24	–	–	1	3/3	–	†
	48	–	–	–	–	†	†
schwacher Blutkreislauf	48	–	–	2/15	–	†	†
kein Blutkreislauf	48	–	3	3/15	2/2	†	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	15/15	–	†	†
keine Pigmentierung	48	–	–	–	2/2	†	†
Dotterödem	48	–	3	7/15	2/2	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	48	–	–	2/15	2/2	†	†
Chordadeformation (Körper)	48	–	–	–	1/2	†	†
Schwanzdeformation	48	–	–	1/15	–	†	†
deformierte Schwanzspitze	48	–	–	–	1/2	†	†
veränderte Chordastruktur	48	–	–	–	1/2	†	†
Otolithen nicht angelegt	48	–	–	1/15	1/2	†	†
Σ teratogen		0	0	3/15 ^a	2/2 ^a	†	†
Σ subletal		0	3	9/17	5/5	†	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : ohne Embryonen, die sich nach der Gastrulation nicht weiterentwickelt hatten

Teratogene Effekte wurden in 3,6 und 7,1 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet. Cycloheximid verursachte Deformationen der Chorda und bei einem Embryo (6,7 %) in 3,6 $\mu\text{mol/L}$ die Deformation des gesamten Schwanzes. Eine veränderte Struktur der Chorda (Abb. 11 a, Seite 35) trat zusammen mit einer deformierten Schwanzspitze bei einem Embryo (50 %) in 7,1 $\mu\text{mol/L}$ auf. In beiden Konzentrationen hatte je ein Embryo keine Otolithen angelegt. Die EC_{50} teratogen (48 h) beträgt 3,7 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,983$; $b = 12,4$; $EC_{10} = 2,9 \mu\text{mol/L}$).

Um eine Wirkung auf das Längenwachstum zu erfassen, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Die Effekte sind in Tab. 17 zusammengestellt.

Tab. 17: Zusammenstellung der Effekte von Cycloheximid auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 h

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	1,8	3,6	7,1	14,2	28,4
koaguliert ^a	120	–	–	6	19	20	20
kein Blutkreislauf	120	–	–	–	1/1	†	†
Perikardoedem	120	–	–	–	1/1	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Augendeformation	120	–	–	–	1/1	†	†
Kopfdeformation	120	–	–	–	1/1	†	†
Schwanzdeformation	120	–	–	1/14	–	†	†
deformierte Schwanzspitze	120	–	–	–	1/1	†	†
Σ teratogen		0	0	1/14	1/1	†	†
Σ subletal		0	0	1/14	1/1	†	†

Anzahl der Larven je „Konzentration“ n = 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : koagulierte und nicht geschlüpfte Embryonen zusammengefaßt

Die nicht geschlüpften Embryonen gingen in die Berechnung der LC_{50} mit ein, da sie bereits koaguliert waren. Die nach der Gastrulation nicht weiter entwickelten Embryonen waren bis zum Meßzeitpunkt nach 120 Stunden koaguliert. Für die letalen Effekte wurde eine LC_{50} (120 h) von $4,6 \mu\text{mol/L}$ ermittelt ($R^2 = 0,988$; $b = 8,1$; $LC_{10} = 3,2 \mu\text{mol/L}$). Durch die verlängerte Testzeit traten nach der Beendigung der Exposition verzögert letale Effekte auf.

In $3,6 \mu\text{mol/L}$ war bei einer Larve (7,1 %) der Schwanz vollkommen deformiert. Die einzige lebende Larve in $7,1 \mu\text{mol/L}$ wies neben einem fehlenden Blutkreislauf, einem Perikardoedem und der deformierten Schwanzspitze noch eine deformierte Kopfanlage und deformierte Augen auf. In Abb. 12 sind die Schwanzlängen der Larven dargestellt.

Aufgrund der Datenlage gingen nur zwei Konzentrationen in die Auswertung ein. Dennoch läßt sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Schwanzlängen erkennen. Bereits in $1,8 \mu\text{mol/L}$ liegt der Mittelwert unter dem der Kontrollen. Eine signifikante Reduktion ($p = 0,05$) wurde für $3,6 \mu\text{mol/L}$ nachgewiesen.

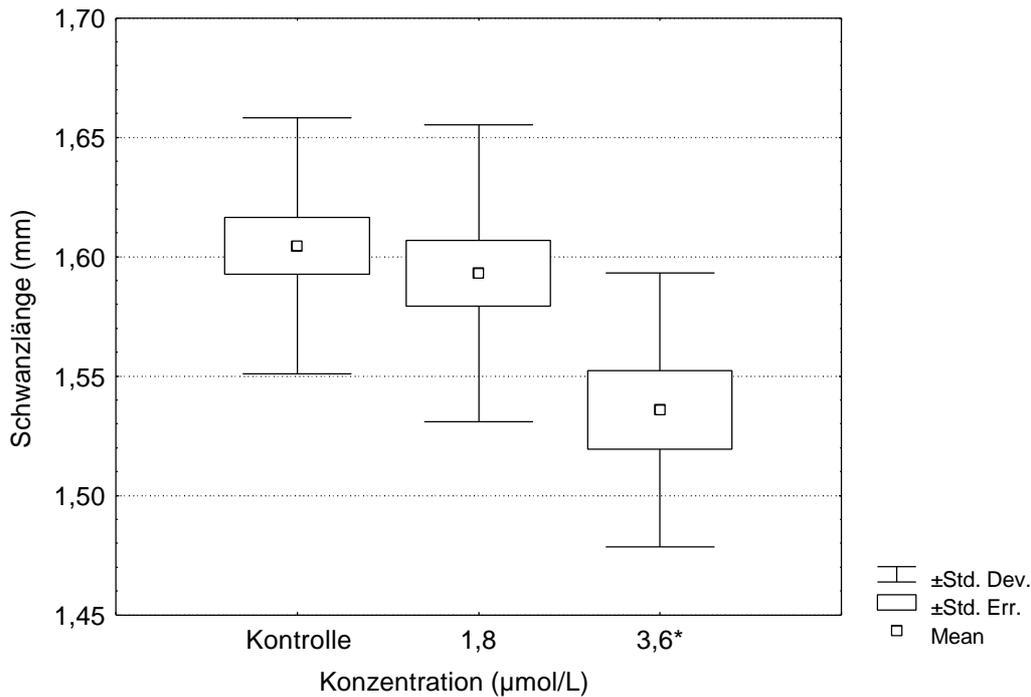


Abb. 12: Wirkung von Cycloheximid auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge: 1,8 / 3,6 µmol/L

Die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC / LOEC sind in Tab. 18 zusammengestellt. Abb. 13 veranschaulicht den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die teratogenen und die letalen Effekte.

Tab. 18: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Cycloheximid

	Zeit (h)	µmol/L
LC_{50}	48	5,2 (4,5 – 6,0)
LC_{50}	120	4,6 (4,0 – 5,4)
EC_{50} Entwicklungsstop	24	5,1 (4,3 – 6,1)
EC_{50} Entwicklungsverzögerung	24	2,4 (2,1 – 2,8)
EC_{50} Herz-Kreislauf	48	3,5 (2,6 – 8,2)
EC_{50} subletal	48	3,2 (2,5 – 4,6)
EC_{50} teratogen	48	3,7 (2,7 – 5,1)
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	1,8 / 3,6
TI		1,41

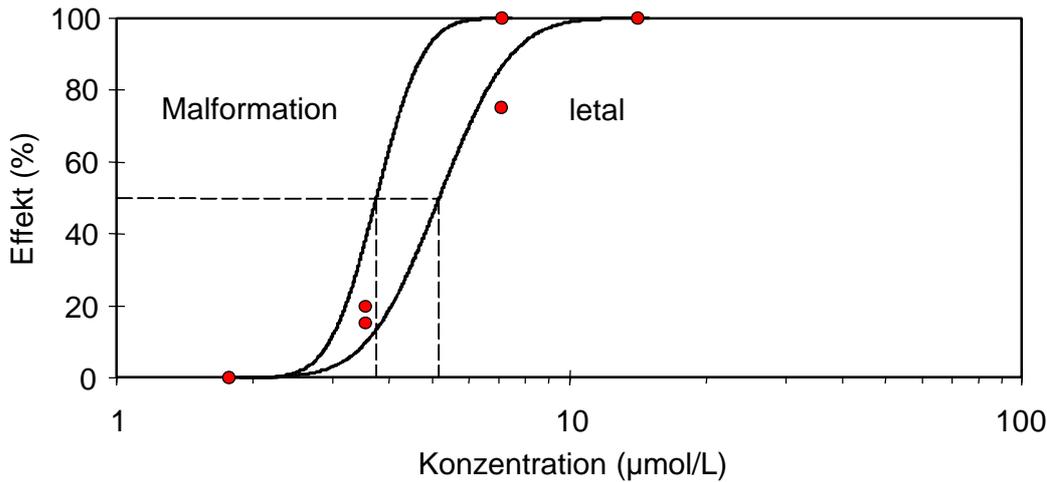


Abb. 13: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Cycloheximid für die teratogenen und die letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 5,2 µmol/L; EC_{50} teratogen (48 h): 3,7 µmol/L

Beide Konzentrations-Wirkungskurven entspringen einem gemeinsamen Punkt auf der Abszisse. Da die Sigmoide für die Malformationen steiler ansteigt ($b = 12,4$) als die Sigmoide für die letalen Effekte ($b = 8,0$), weitet sich mit zunehmendem Verlauf der Bereich zwischen beiden Kurven. Teratogene Effekte wurden nur in Konzentrationen beobachtet, in denen auch letale Effekte auftraten bzw. sogar überwogen. Das trifft auch für die signifikante Reduktion ($p = 0,05$) der Schwanzlänge zu. Mit *DarT* wurden für Cycloheximid teratogene Effekte nachgewiesen, die jedoch im Bereich der letalen Effekte auftraten. Für den Teratogenitätsindex TI wurde ein Wert von 1,41 berechnet.

Lewis (2000) bezeichnet Cycloheximid als Substanz, die im Tierversuch teratogene Effekte verursacht. Nach Lary et al. (1982) verursachen 30 mg/kg dieses Proteinsynthesehemmers (i.p.r., Gestationstag 9) bei der Maus Skelettdeformationen vor allem an den Gliedmaßen.

Bei der Ratte tötete 1 mg intraperitoneal appliziertes Cycloheximid (Gestationstag 11) die Embryonen ab. Die Applikation am sechsten Gestationstag verursachte bei 24 % der lebenden Neugeborenen Wachstumsretardierungen. Bei Untersuchungen an Mäusen wurde eine erhöhte Resorption der Embryonen (10 mg/kg) bzw. Embryoletalität (80 mg/kg) festgestellt, ohne daß Mißbildungen auftraten (Shepard, 1992).

Bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* lagen teratogene und letale Effekte ebenfalls eng beieinander. Die im *DarT* von Cycloheximid verursachte Wachstumsreduzierung wird auch bei säugertoxikologischen Untersuchungen beschrieben. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Untersuchungen mit den Embryonen von *D. rerio* die Verhältnisse beim Säuger widerspiegeln.

3.5 Ethanol

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde Ethanol in den Konzentrationen 141,1; 169,3; 204,0; 243,1 und 293,0 mmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Für die Osmolarität wurden in allen Konzentrationen Werte über 100 mOsmol/L gemessen, so daß osmotische Effekte nicht ausgeschlossen werden können (Lange et al., 1995). Die Meßwerte sind in Tab. A 12 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da bei den Kontrollen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 19 und Tab. 20).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 19 aufgeführt. Letale Effekte traten bereits ab acht Stunden auf. Die Zahl der abgestorbenen Embryonen erhöhte sich in den drei höchsten Konzentrationen bis 24 Stunden und blieb dann konstant. Die LC_{50} (48 h) beträgt 260,3 mmol/L ($R^2 = 0,999$; $b = 15,8$; $LC_{10} = 216,0$ mmol/L).

Tab. 19: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ethanol

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	141,1	169,3	204,0	243,1	293,0
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	1
	12	–	–	–	–	1	5
	24	–	–	–	1	6	16
	36	–	–	–	1	6	16
	48	–	–	–	1	6	16

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 20 sind die durch Ethanol verursachten subletalen Effekte zusammengefaßt. Nach 2,5 Stunden hatten sich in allen Konzentrationen bei 15 – 25 % der Embryonen Bläschen abgeschnürt. Dieser Effekt war teilweise bis zum Meßzeitpunkt nach zwölf Stunden zu beobachten. Da die Osmolarität zwischen 141 und 290 mOsmol/L betrug, handelt es sich hierbei vermutlich um osmotisch bedingte Abschnürungen an den Blastomeren.

Ethanol greift störend in die frühen Phasen der Ontogenese ein. In der höchsten Konzentration hatten fünf Embryonen (25 %) keine hohe Blastula angelegt. Nach acht bzw. zwölf Stunden wurde in allen Konzentrationen (außer 141,1 mmol/L) eine massive Verzögerungen der Epiboliebewegung festgestellt. Für die Entwicklungsverzögerung nach zwölf Stunden ließ sich eine EC_{50} von 208,0 mmol/L berechnen ($b = 16,7$; $EC_{10} = 174,3$ mmol/L). Die verzögerte Entwicklung der Embryonen manifestierte sich bis zum Meßzeitpunkt nach 24 Stunden. Deutlich wurde dies bei der Schwanzablösung vom Dotter und der Entwicklung der Augen. Die EC_{50} Entwicklungsverzögerung (24 h) beträgt 225,9 mmol/L ($R^2 = 0,914$; $b = 8,5$; $EC_{10} = 159,4$ mmol/L). Zu diesem Zeitpunkt ließen in 169,3 mmol/L ein (5 %), in 204,0 mmol/L drei (15,8 %), in 243,1 mmol/L fünf (35,7 %) und in der höchsten Konzentration alle vier lebenden Embryonen (100 %) keine Spontanbewegung erkennen. Für diesen Endpunkt berechnete sich eine EC_{50} (24 h) von 248,7 mmol/L ($b = 11,5$; $EC_{10} = 192,2$ mmol/L).

Tab. 20: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ethanol auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	141,1	169,3	204,0	243,1	293,0
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	–	–	5
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	5	3	3	5	4
	8	–	–	–	4	3	6/19
	12	–	–	3	4	2/19	–
keine / verzögerte Gastrulation	8	–	–	–	–	–	5/19
Gastrulation nicht beendet	12	–	–	3	5	18/19	15/15
keine Spontanbewegung	24	–	–	1	3/19	5/14	4/4
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	1	2	6/19	9/14	1/4
	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	–	–
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	2/14	2/4
	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	–	–
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	2/14	1/4
	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	–	–
kein Herzschlag	36	–	–	–	–	–	2/4
	48	–	–	–	–	2/14	–
schwacher Blutkreislauf	36	–	4	1	–	–	–
	48	–	–	–	–	–	–
kein Blutkreislauf	36	–	5	15	19/19	14/14	4/4
	48	–	1	8	11/19	13/14	4/4
keine Pigmentierung	48	–	–	–	–	1/14	3/4
Dotterödem	48	–	1	9	8/19	9/14	–
Perikardoedem	48	–	1	10	12/19	6/14	3/4
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	4/14	4/4
	36	–	–	–	–	4/14	4/4
	48	–	–	–	–	3/14	4/4
unterentwickelter Kopf ^a	24	–	–	–	–	3/14	2/4
	36	–	–	–	–	3/14	1/4
	48	–	–	–	–	3/14	1/4
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	3/14	3/4
	36	–	–	–	–	3/14	3/4
	48	–	–	–	–	3/14	3/4
Spaltembryo	24	–	–	–	–	2/14	1/4
	36	–	–	–	–	2/14	1/4
	48	–	–	–	–	2/14	1/4
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	–	1/14	1/4
Σ teratogen		0	0	0	0	5/14	4/4
Σ subletal		0	1	12	17/19	14/14	4/4

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : Mikrozephalie

Eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems wurde sowohl nach 36 als auch nach 48 Stunden in allen Konzentrationen deutlich. Nach 36 Stunden beträgt die EC_{50} für diesen Endpunkt 145,2 mmol/L ($b = 14,9$; $EC_{10} = 119,1$ mmol/L). Für die EC_{50} Herz-Kreislauf (48 h) wurde ein Wert von 187,5 mmol/L berechnet ($R^2 = 0,965$; $b = 12,4$; $EC_{10} = 147,8$ mmol/L). In Abb. 14 sind die Herzschlagfrequenzen der Embryonen dargestellt. Die Mediane der beiden geringsten Konzentrationen entsprechen dem der Kontrolle. Ab 204,0 mmol/L läßt sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Herzschlagfrequenz erkennen, die ab 243,1 mmol/L signifikant ist ($p = 0,05$). Die Werte streuen in 204,0 mmol/L am weitesten. In 293,0 mmol/L gingen nur vier Embryonen in die Auswertung ein, so daß dieser Wert entsprechend kritisch zu bewerten ist.

Oedeme an Dotter und Perikard traten in allen Konzentrationen vermehrt auf. In den beiden höchsten Konzentrationen hatten einzelne Embryonen keine Melanocyten ausgebildet. Für die Summe der subletalen Effekte ließ sich nach 48 Stunden eine EC_{50} subletal von 170,5 mmol/L berechnen ($R^2 = 0,967$; $b = 18,1$; $EC_{10} = 144,8$ mmol/L).

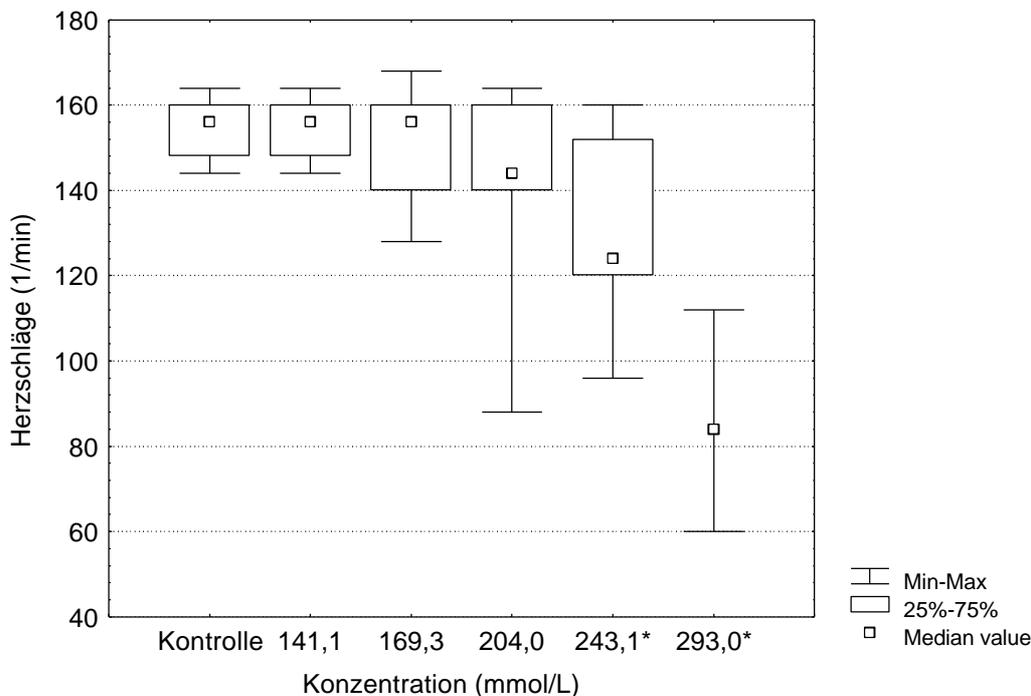


Abb. 14: Wirkung von Ethanol auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz: 204,0 / 243,1 mmol/L

Teratogene Effekte traten in den beiden höchsten Konzentrationen auf. Deformationen der Chorda und des Schwanzes wurden bei fünf Embryonen (35,7 %) in 243,1 mmol/L und bei allen vier lebenden Embryonen in 293,0 mmol/L beobachtet. Der Kopf war bei drei Embryonen (21,4 %) in 243,1 mmol/L und bei einem (25 %) in 293,0 mmol/L unterentwickelt (Abb. 15). Die Symptome eines Spaltembryos traten in 243,1 mmol/L bei zwei (14,3 %) und in 293,0 mmol/L bei einem Embryo (25 %) auf. In diesen beiden Konzentrationen hatte je einer dieser Spaltembryonen keinen Sacculi angelegt (7,1 bzw.

25 %). Die $EC_{50 \text{ teratogen}}$ (48 h) beträgt 245,5 mmol/L ($R^2 = 0,999$; $b = 47,3$; $EC_{10} = 230,7$ mmol/L). Die Wirkung von Ethanol auf das Längenwachstum wurde nicht untersucht.



Abb. 15: Embryo nach 24stündiger Exposition in 293,1 mmol/L Ethanol

Schwanz unvollständig abgelöst und deformiert, Chordadeformation, Mikrozephalie, Otolithen nicht angelegt (55fache Vergrößerung)

In Tab. 21 sind die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC / LOEC zusammengestellt, Abb. 16 verdeutlicht die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für teratogene und letale Effekte.

Tab. 21: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Ethanol

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	260,3 (245,8 – 275,6)
EC_{50} Entwicklungsverzögerung	12	208,0 (196,8 – 220,1)
EC_{50} Entwicklungsverzögerung	24	225,9 (202,6 – 252,0)
EC_{50} Spontanbewegung	24	248,7 (228,3 – 296,9)
EC_{50} Herz-Kreislauf	36	145,2 (129,0 – 154,6)
EC_{50} Herz-Kreislauf	48	187,5 (175,8 – 200,1)
EC_{50} subletal	48	170,5 (162,0 – 179,5)
EC_{50} teratogen	48	245,5 (234,9 – 256,5)
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	204,0 / 243,1
TI		1,06

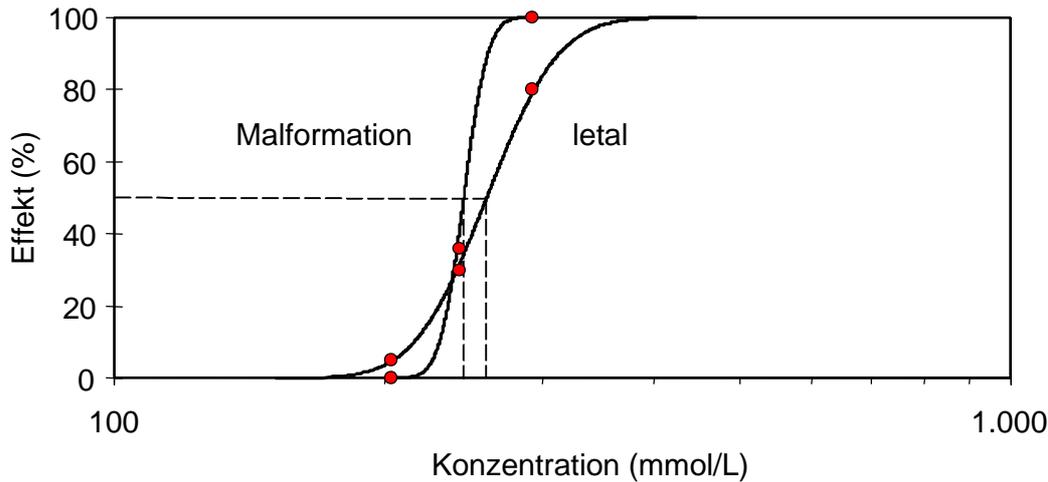


Abb. 16: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Ethanol für die teratogenen und die letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 260,3 mmol/L; EC_{50} teratogen (48 h): 245,5 mmol/L

Letale und teratogene Effekte traten in dem selben Konzentrationsbereich auf. Beide Kurven sind nicht deutlich voneinander getrennt. Da die Sigmoide für die letalen Effekte flacher verläuft ($b = 15,8$), überschneidet sie sich mit der Kurve für die teratogenen Effekte ($b = 47,3$). Werden LC_{50} und EC_{50} teratogen miteinander verglichen, dann ergibt sich ein geringer Teratogenitätsindex TI von 1,06. Andererseits wurden durch Ethanol sehr massive teratogene Effekte wie Spaltembryonen und Mikrozephalie verursacht.

Im *DarT* zeigte sich für Ethanol ein teratogenes Potential in hohen Konzentrationen, in denen bereits letale und allgemein toxische Effekte auftraten.

Beim Menschen führt chronischer Alkoholabusus während der Schwangerschaft zu einer Reihe von Symptomen, die unter dem Begriff „Alkoholembryopathie“ oder auch „Fetales Alkoholsyndrom (FAS)“ zusammengefaßt werden. Dazu zählen beispielsweise: Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, kraniofaziale Dysmorphien wie schmale Stirn und verkürzter Nasenrücken, aber auch Herzfehler und Extremitätenfehlbildungen. Es ist allgemein anerkannt, daß für die Auslösung des FAS bereits vor der Schwangerschaft chronischer Alkoholismus bestehen muß. Dazu kommt noch die Alkoholexposition des Embryos bzw. Fetus während der Entwicklung. Zur Zeit ist es schwer abzuschätzen, welchen Anteil an der pränatalen Schädigung der Alkohol direkt hat und welche Bedeutung die Stoffwechseländerungen im mütterlichen Organismus bei chronischem Alkoholismus einnehmen (Marquardt & Schäfer, 1994).

Lewis (2000) stuft Ethanol als Substanz ein, die im Tierversuch teratogene Effekte verursachen kann. Chernoff (1977) fütterte trächtige Mäuse mit ethanolhaltiger Nahrung (15 – 30 % Kalorienanteil) und fand Herzdefekte und Mißbildungen des Augenlides. Der Anteil toter und resorbierter Embryonen erhöhte sich mit zunehmender Konzentration. Trächtige Ratten wurden mit ethanolhaltigem Futter (35 % Kalorienanteil, 6. – 20. Gestationstag) gefüttert. Bei diesen hohen Konzentrationen wiesen die Nachkommen kraniofaziale Mißbildungen auf (Edwards & Dow-Edwards, 1991).

Ethanol wird mittels Alkoholdehydrogenase vor allem in der Leber zu Acetaldehyd umgewandelt, bevor dieses weiter metabolisiert wird. Acetaldehyd verursacht bei der Maus Neuralrohrdefekte und Symptome, die dem FAS entsprechen und stellt vermutlich das eigentliche toxische Agens dar (Shepard, 1992). Campbell & Fantel (1983) untersuchten die Wirkung von Acetaldehyd auf Rattenembryonen in „Whole Embryo Culture“ und fanden Wachstumsretardierung bei Exposition gegenüber 25 – 75 µmol/L. 100 µmol/L erwiesen sich als embryolethal.

Im *DarT* verursachte Ethanol neben einer ausgeprägten Entwicklungsverzögerung auch massive teratogene Effekte wie offener Medianspalt (Spaltembryo) und Mikrozephalie in Konzentrationen ab 243,1 mmol/L. Diese Beobachtungen bestätigen die Untersuchungen von Baumann & Sander (1984), die bei *D. rerio* durch Ethanolexposition ebenfalls Spaltembryonen auslösten. Auch beim Säuger verursacht Ethanol in hohen Konzentrationen Wachstumsretardierungen und Malformationen. Die im *DarT* erhaltenen Befunde spiegeln die Verhältnisse beim Säuger gut wider.

3.6 Ethylacetat

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurde Ethylacetat in folgenden Konzentrationen untersucht: 12,5; 18,6; 27,9; 42,0 und 63,1 mmol/L. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die ermittelten Werte für die Osmolarität ließen keine Auswirkungen auf die Embryonen erwarten. Die Meßwerte können der Tab. A 13 (Anhang A) entnommen werden. Der Test ist valide, da nicht mehr als 5 % der Kontrollembryonen letale und subletale Effekte aufwiesen (siehe Tab. 22 und Tab. 23).

Die von Ethylacetat verursachten letalen Effekte sind in Tab. 22 zusammengestellt. Die ersten letalen Effekte wurden nach 24 Stunden beobachtet, wobei sich sowohl zu diesem Zeitpunkt als auch nach 48 Stunden eine konzentrationsabhängige Zunahme der letalen Effekte feststellen ließ. Für die LC_{50} (48 h) wurde ein Wert von 21,1 mmol/L berechnet ($R^2 = 0,975$; $b = 6,1$; $LC_{10} = 13,0$ mmol/L).

Tab. 22: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ethylacetat

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	12,5	18,6	27,9	42,0	63,1
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	2	4	13	19
	48	–	2	6	16	20	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 23 aufgeführt. Bereits die Stadien der frühen Embryonalentwicklung wurden von Ethylacetat gestört. In der höchsten Konzentration hatten sieben Embryonen (35 %) und in 42,0 mmol/L drei Embryonen (15 %) keine hohe Blastula ausgebildet. Die frühen Zellteilungen der Blastomeren waren so stark beeinflusst, daß keine Epiboliebewegung stattfand und diese Embryonen bis zum Meßzeitpunkt nach 24 Stunden

abstarben. Weitere Embryonen ließen nach acht Stunden ebenfalls keine Gastrulation erkennen. Für diesen Effekt beträgt die EC_{50} (8 h) 42,3 mmol/L ($R^2 = 0,975$; $b = 2,8$; $EC_{10} = 14,7$ mmol/L). Diese Störungen der Epiboliebewegung führten in den höheren Konzentrationen zum Absterben der Embryonen; in den niedrigen Konzentrationen zu einer Verzögerung der späteren Embryonalentwicklung. Deutlich wird das bei den Endpunkten der Schwanzablösung vom Dotter und der Entwicklung der Augen. Nach 24 Stunden hatten in 18,6 mmol/L drei Embryonen (16,7 %), in 27,9 mmol/L 14 Embryonen (87,5 %) und in den beiden höchsten Konzentrationen alle noch lebenden Embryonen (sieben bzw. einer) die Gastrulation noch nicht beendet. Die EC_{50} für die verzögerte Gastrulation zu diesem Zeitpunkt beträgt 22,7 mmol/L ($R^2 = 0,997$; $b = 13,9$; $EC_{10} = 18,3$ mmol/L). Bis auf drei Embryonen (75 %) in 27,9 mmol/L koagulierten alle diese Embryonen innerhalb der folgenden 24 Stunden.

Eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ließ sich nach 48 Stunden bei der Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems erkennen. In 12,5 mmol/L waren sieben Embryonen (38,9 %), in 18,6 mmol/L zwölf Embryonen (85,7 %) und in 27,9 mmol/L der einzige Embryo, der sich entsprechend weit entwickelt hatte, davon betroffen. Die EC_{50} Herz-Kreislauf (48 h) beträgt 13,8 mmol/L ($R^2 = 0,967$; $b = 11,5$; $EC_{10} = 10,7$ mmol/L).

Oedeme traten in 12,5 und 18,6 mmol/L vermehrt auf, wobei ein Kontrollembryo ebenfalls ein Dotteroedem aufwies. Sowohl für die verminderte Bildung von Melanocyten als auch für das vollständige Fehlen der Pigmentierung nach 48 Stunden bestand eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Es wurde eine EC_{50} Pigmentierung (48 h) von 13,7 mmol/L berechnet ($R^2 = 0,998$; $b = 11,9$; $EC_{10} = 10,7$ mmol/L).

Für die Summe aller subletaler Effekte wurde mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode eine EC_{50} (48 h) von 13,6 mmol/L berechnet. Aufgrund der Datenlage konnte kein Vertrauensbereich angegeben werden. Der Wert ist entsprechend kritisch zu beurteilen.

Tab. 23: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ethylacetat auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	12,5	18,6	27,9	42,0	63,1
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	–	2	3
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	–	3	7
keine Gastrulation	8	–	–	3	7	9	14
Gastrulation nicht beendet	24	–	–	3/18	14/16	7/7	1/1
	48	–	–	–	3/4	†	†
keine Spontanbewegung	24	–	14	14/15	2/2	–	–
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	2/2	–	–
	48	–	–	–	1/1	†	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	3	–	–	–	–
	48	–	2/18	6/14	–	†	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	16	15/15	2/2	–	–
	48	–	–	3/14	1/1	†	†
diffuse Augenanlage	24	1	18	13/15	–	–	–
	48	–	2/18	9/14	–	†	†
keine Augenanlage	24	–	2	2/15	2/2	–	–
	48	–	–	–	1/1	†	†
schwacher Herzschlag	48	–	2/18	–	–	†	†
kein Herzschlag	48	–	2/18	10/14	1/1	†	†
kein Blutkreislauf	48	–	6/18	12/14	1/1	†	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	3/18	4/14	–	†	†
keine Pigmentierung	48	–	3/18	9/14	1/1	†	†
Dotterödem	48	1	4/18	9/14	–	†	†
Perikardoedem	48	–	2/18	7/14	–	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	1/18	1/14	–	†	†
keine Kopfanlage	24	–	–	–	1/2	–	–
	48	–	–	–	–	†	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	1/18	–	–	†	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	1/18	1/14	–	†	†
Otolithen nicht angelegt	48	–	–	2/14	–	†	†
Σ teratogen		0	1/18	3/14	–	†	†
Σ subletal		1	7/18	14/14	4/4	†	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Malformationen wurden an Embryonen festgestellt, die durch die Entwicklungsverzögerung allgemein stark geschädigt waren. Bei allen war nach 48 Stunden der Schwanz nicht abgelöst, sie ließen keinen Herzschlag erkennen, hatten nur eine diffuse Augenanlage und keine

Melanocyten ausgebildet. In der geringsten Konzentration betraf das einen Embryo (5,6 %), der eine Deformation der Chorda, des Schwanzes und eine deformierte Schwanzspitze aufwies. In 18,6 mmol/L waren drei Embryonen (16,7 %) betroffen. Zwei hatten keine Otolithen angelegt, wobei ein Embryo zusätzlich eine deformierte Schwanzspitze aufwies. Der dritte Embryo ließ eine Deformation der Chorda erkennen. Eine EC_{50} teratogen (48 h) konnte nicht berechnet werden. Der einzige Embryo, der in 27,9 mmol/L die Gastrulation beendet hatte, wies keine Somiten auf. Er hatte demzufolge den Schwanz nicht abgelöst und keine Augen entwickelt. Der zweite Embryo, der in dieser Konzentration nach 24 Stunden keine Somiten und keinen Kopf angelegt hatte, war bereits koaguliert.

In Tab. 24 sind die berechneten Werte zusammengestellt.

Tab. 24: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Ethylacetat

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	21,1 (18,3 – 24,2)
EC ₅₀ Gastrulation	8	42,3 (32,7 – 54,8)
EC ₅₀ Gastrulation	24	22,7 (20,6 – 24,9)
EC ₅₀ Herz-Kreislauf	48	13,8 (12,4 – 15,3)
EC ₅₀ Pigmentierung	48	13,7 (12,4 – 15,2)
EC ₅₀ subletal	48	13,6
EC ₅₀ teratogen **	48	23,6 (18,7 - >12*10 ⁶)
TI**		0,89

** : Wert nicht valide – siehe unten

Durch Ethylacetat wurden teratogene Effekte an den Embryonen von *D. rerio* in Konzentrationen verursacht, in denen bereits letale Effekte auftraten. Einzelne Embryonen, die durch allgemein toxische Effekte stark geschädigt waren, wiesen auch moderate Mißbildungen auf. Die unspezifischen Deformationen des Schwanzes werden auf eine allgemeine Entwicklungsstörung mit Verzögerung der Entwicklung während und nach der Gastrulation zurückgeführt. Aufgrund dieser Beobachtungen wird geschlußfolgert, daß Ethylacetat im *DarT* kein teratogenes Potential erkennen läßt.

Zur quantitativen Abschätzung des teratogenen Potentials wurde der einzige Embryo in 27,9 mmol/L, der sich nach der Gastrulation überhaupt weiterentwickelt hatte und stark deformiert war (keine Somiten, Schwanz nicht abgelöst, keine Augen), mit in eine Kalkulation einer EC_{50} teratogen ** (48 h) einbezogen. Es ergibt sich ein Wert von 23,6 mmol/L ($b = 6,2$; $EC_{10} = 14,7$ mmol/L). Dieser Wert ist kritisch zu betrachten, zumal sich der 95 %ige Vertrauensbereich von 18,7 bis über $12 \cdot 10^6$ mmol/L erstreckt. Der sich aus dem Vergleich mit der LC₅₀ ergebende TI** beträgt 0,89. Unter Beachtung der genannten Einschränkungen bestärkt dieser Wert die oben genannte Schlußfolgerung, daß sich für Ethylacetat im *DarT* kein teratogenes Potential zeigte.

Nach Lewis (2000) verursacht Ethylacetat bei Säugern keine teratogenen Effekte. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* spiegeln die bekannten Verhältnisse bei Säugetieren wider.

3.7 a-D-Glucose

Nach Vorversuchen wurde a-D-Glucose in den Konzentrationen 222,0; 288,6; 375,2; 487,8 und 634,1 mmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung und pH-Werte lagen sowohl im Kontrollmedium als auch in den Testlösungen in dem für den Test zulässigen Bereich. Für die Osmolarität wurden Werte zwischen 227 und 690 mOsmol/L gemessen. Nach Lange et al. (1995) kann bis 100 mOsmol/L eine Schädigung der Embryonen durch osmotische Effekte ausgeschlossen werden. Bei der Interpretation der nachfolgend aufgeführten Effekte muß die hohe Osmolarität der Testlösungen mit berücksichtigen werden. Die Werte sind in Tab. A 14 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da bei den Kontrollembryonen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 25 und Tab. 26).

In den beiden höchsten Konzentrationen wurden bereits nach acht Stunden koagulierte Embryonen festgestellt, ab 24 Stunden waren alle Embryonen abgestorben (siehe Tab. 25). Die LC₅₀ (48 h) wurde durch Bildung des geometrischen Mittels berechnet und beträgt 427,8 mmol/L.

Tab. 25: Zusammenstellung der letalen Effekte von a-D-Glucose

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	222,0	288,6	375,2	487,8	634,1
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	7	15
	24	–	–	–	–	20	20
	36	–	–	–	–	20	20
	48	–	–	–	–	20	20

In 222,0 mmol/L und in 288,6 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Ein Hinweis auf starke osmotische Effekte gaben in den beiden höchsten Konzentrationen bereits nach 2,5 Stunden zahlreich abgeschnürte Bläschen (Abb. 18, Seite 52). In 487,8 mmol/L war bei 90 % der Embryonen die Phase der späten Furchungsstadien (Laale, 1977) gestört, was zur Bildung von irregulären Blastomeren führte. Diese dem Dotter aufsitzende hohe Blastula war deformiert bzw. wurde nicht angelegt, und die frühzeitig in ihrer Entwicklung gestörten Embryonen starben innerhalb der nächsten 20 Stunden ab. Die subletalen Effekte sind in Tab. 26 aufgeführt.

Tab. 26: Zusammenstellung der subletalen Effekte von α -D-Glucose auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	222,0	288,6	375,2	487,8	634,1
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	–	18	1
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	–	5	10
	8	–	–	–	2	13/13	4/5
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	9	†	†
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	9	†	†
	36	–	–	–	9	†	†
	48	–	–	–	9	†	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	9	†	†
	36	–	–	–	1	†	†
	48	–	–	–	2	†	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	2	†	†
	36	–	–	–	1	†	†
	48	–	–	–	–	†	†
schwacher Herzschlag	36	–	–	–	2	†	†
	48	–	–	–	–	†	†
kein Herzschlag	36	–	1/19	–	7	†	†
	48	–	–	1/19	1	†	†
schwacher Blutkreislauf	36	–	1/19	–	–	†	†
	48	–	–	1/19	–	†	†
kein Blutkreislauf	36	–	4/19	15/19	20	†	†
	48	–	–	4/19	20	†	†
Dotterödem	48	–	–	–	6	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	2	†	†
	36	–	–	–	2	†	†
	48	–	–	–	4	†	†
Chordadeformation (Körper)	24	–	–	–	1	†	†
	36	–	–	–	1	†	†
	48	–	–	–	1	†	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	11	†	†
	36	–	–	–	11	†	†
	48	–	–	–	11	†	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	3	†	†
	36	–	–	–	4	†	†
	48	–	–	–	6	†	†
Kopfdeformation	24	–	–	–	1	†	†
	36	–	–	–	1	†	†
	48	–	–	–	1	†	†
Chorda nicht angelegt	48	–	–	–	2	†	†
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	1	†	†
Σ teratogen		0	0	0	16	†	†
Σ subletal		0	0	5/19	20	†	†

In 222,0 mmol/L und in 288,6 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

In 375,2 mmol/L hatten 45 % der Embryonen keine Somiten gebildet. Dadurch wurden Schwanzdeformationen bedingt, die nur in dieser Konzentration auftraten (siehe unten). Eine Verzögerung der Augenentwicklung bei 55 % der Embryonen dieser Konzentration wurde in den folgenden 24 Stunden überwiegend aufgehoben. Verschiedene Effekte spiegeln einen Einfluß auf das Herz-Kreislaufsystem wider. Nach 36 Stunden wurde eine konzentrationsabhängige Verzögerung in der Ausprägung von Herzschlag und Blutkreislauf festgestellt. Die EC_{50} Herz-Kreislauf (36 h) beträgt 248,6 mmol/L ($b = 13,7$; $EC_{10} = 200,4$ mmol/L). Nach 48 Stunden war die Herzschlagfrequenz ab 375,2 mmol/L signifikant reduziert ($p = 0,05$). In Abb. 17 sind die Herzschläge dargestellt. Auffällig ist die weite Streuung der Werte in 375,2 mmol/L von 44 bis 140 Schlägen pro Minute. Die Herzschläge der Embryonen in dieser Konzentration wiesen eine sehr geringe Intensität und unregelmäßige Rhythmik auf. Für die Summe der subletalen Effekte nach 48 Stunden beträgt die EC_{50} 293,0 mmol/L ($R^2 = 0,990$; $b = 32,6$; $EC_{10} = 267,6$ mmol/L).

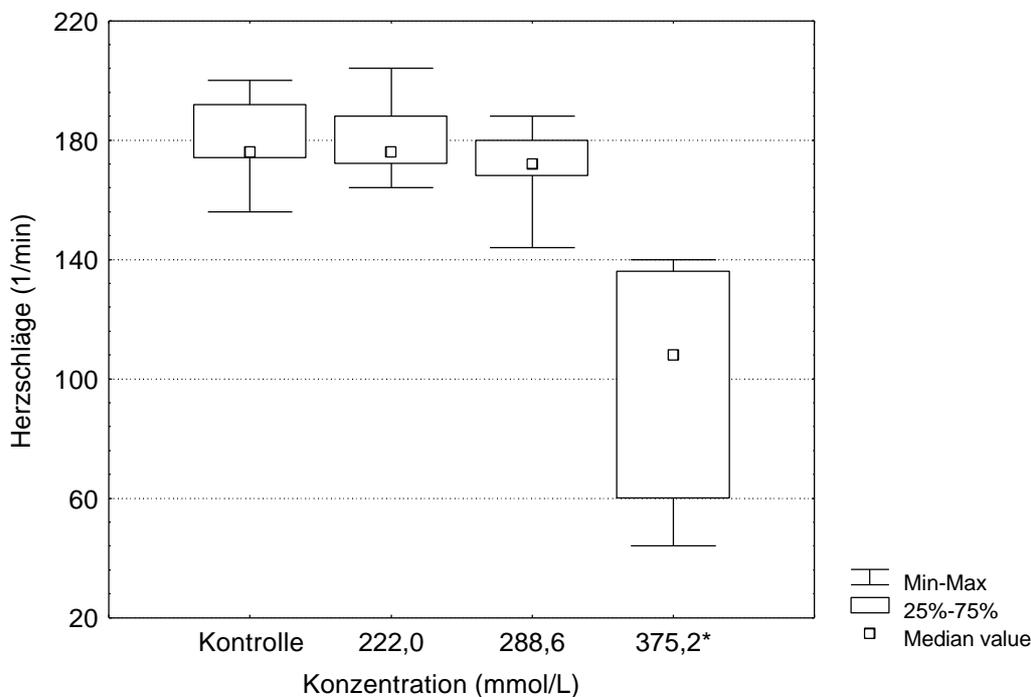


Abb. 17: Wirkung von α -D-Glucose auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz: 288,6 / 375,2 mmol/L

In 375,2 mmol/L wurden nach 48 Stunden 16 Embryonen (80 %) mit Malformationen festgestellt. Es fanden sich vor allem Deformationen des Schwanzes, der Schwanzspitze und der Chorda. Bei elf Embryonen (55 %) war der Schwanz deformiert und nicht vom Dotter abgelöst. Neun dieser Embryonen (45 %) hatten keine Somiten angelegt. Ein Embryo (5 %) wies eine Kopfdeformation mit diffuser Augenanlage auf und bei zwei Embryonen (10 %) konnte keine Chorda erkannt werden. In den anderen Konzentrationen wurden keine teratogenen Effekte festgestellt. Mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode wurde eine EC_{50} teratogen (48 h) von 340,1 mmol/L errechnet. Es gab keinen Hinweis auf Reduktion des Längenwachstums.



Abb. 18: Embryo nach 2,5stündiger Exposition in 634,1 mmol/L a-D-Glucose
hohe Blastula mit abgeschnürten Bläschen (60fache Vergrößerung)

Die berechneten EC_{50} , LC_{50} und NOEC / LOEC sind in Tab. 27 zusammengestellt. Abb. 19 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für letale und teratogene Effekte.

Tab. 27: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für a-D-Glucose

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	427,8
EC_{50} Herz-Kreislauf	36	248,6 (226,4 – 268,1)
EC_{50} subletal	48	293,0 (279,4 – 307,2)
EC_{50} teratogen	48	340,1
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	288,6 / 375,2
TI		1,26

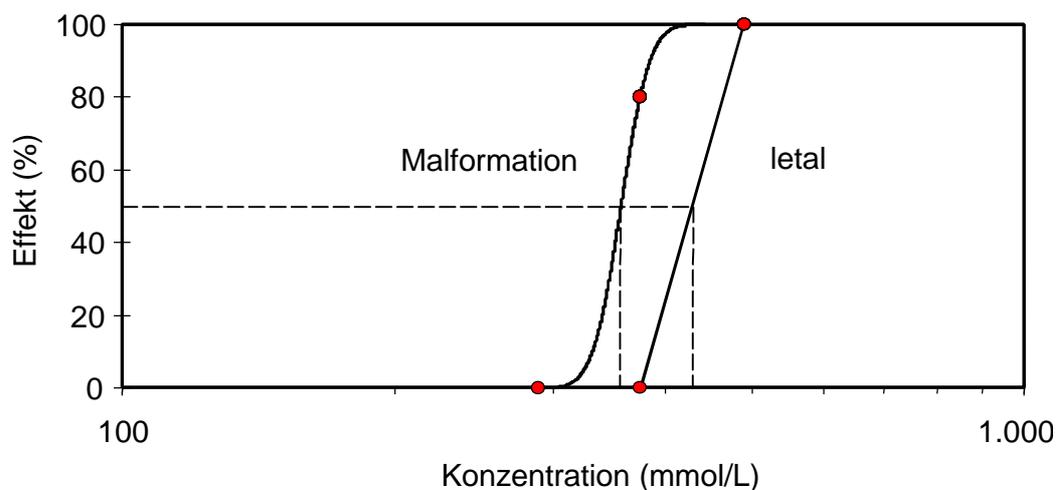


Abb. 19: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von a-D-Glucose für die teratogenen und letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 427,8 mmol/L; EC_{50} teratogen (48 h): 340,1 mmol/L

Die Sigmoide für die teratogenen Effekte und die Gerade der letalen Effekte sind voneinander getrennt, liegen aber eng beieinander. Beide verlaufen sehr steil und spiegeln die Tatsache wider, daß sich entsprechende Effekte nur in einem kleinen Konzentrationsbereich finden. Der Verlauf der Sigmoide für die teratogenen Effekte ist unter Vorbehalt zu betrachten, da sie anhand zweier Punkte (0 % und 80 %) erstellt wurde. Werden LC_{50} und $EC_{50 \text{ teratogen}}$ ins Verhältnis gesetzt, dann ergibt sich für den Teratogenitätsindex TI ein Wert von 1,26.

Es wurden Deformationen des Schwanzes, der Chorda und auch des Kopfes festgestellt. Diese Malformationen gingen zum Großteil auf die fehlende Entwicklung der Somiten zurück, so daß diese Embryonen durch die allgemein toxischen Effekte bereits stark geschädigt waren. Zudem traten die Malformationen nur in einer recht hohen Konzentration auf, die zum letalen Konzentrationsbereich einen geringen Abstand hatte. Vor diesem Hintergrund gilt die Aussage als gerechtfertigt, daß a-D-Glucose im *DarT* kein teratogenes Potential erkennen ließ.

Es liegen keine Hinweise vor, daß a-D-Glucose beim Säuger teratogene Effekte verursacht.

3.8 Glykoetherverbindungen

3.8.1 Diethylenglykoldimethylether und Metabolite

Untersucht wurden Diethylenglykoldimethylether, 2-Methoxyethanol und Methoxyessigsäure. Die im *DarT* erzielten Ergebnisse werden folgend dargestellt. Zusätzlich werden hier die Ergebnisse der Untersuchungen mit Methoxyessigsäureisopropylester dargelegt. Methoxyessigsäureisopropylester hydrolysiert zu Methoxyessigsäure, die als das ultimate Teratogen angesehen werden kann (BASF, 1999).

3.8.1.1 Diethylenglykoldimethylether

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde Diethylenglykoldimethylether in folgenden Konzentrationen untersucht: 29,8; 41,7; 58,4; 81,8 und 114,5 mmol/L. Sowohl Sauerstoffsättigung als auch pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. In der höchsten untersuchten Konzentration wurde eine Osmolarität von 122 mOsmol/L gemessen. Da keine abgeschnürten Bläschen auftraten, wird davon ausgegangen, daß Diethylenglykoldimethylether in den untersuchten Konzentrationen keine osmotischen Effekte verursachte. Die Meßwerte sind in Tab. A 9 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da bei den Kontrollen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 28 und Tab. 29).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 28 zusammengestellt. Die ermittelte LC_{50} (48 h) beträgt 82,4 mmol/L ($R^2 = 0,998$; $b = 25,5$; $LC_{10} = 73,4$ mmol/L).

Tab. 28: Zusammenstellung der letalen Effekte von Diethylenglykoldimethylether

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	29,8	41,7	58,4	81,8	114,5
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	7	20
	48	–	–	–	–	8	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die durch Diethylenglykoldimethylether verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 29 aufgeführt. Betrachtet man die Endpunkte „Schwanz nicht abgelöst“, „diffuse Augenanlage“ und „keine Augenanlage“ nach 24 und 48 Stunden, so wird in 81,8 mmol/L eine Entwicklungsverzögerung deutlich. Ein Embryo (8,3 %) dieser Konzentration wies nach 48 Stunden schwere Mißbildungen auf (siehe unten) und hatte bis zu diesem Zeitpunkt weder Augen entwickelt noch den Schwanz abgelöst. Eine funktionale Störung des Herz-Kreislaufsystems wurde nach 48 Stunden am fehlenden Blutkreislauf deutlich. Oedeme traten in allen Konzentrationen vermehrt auf. Es wurde eine $EC_{50 \text{ Oedeme}}$ (48 h) von 48,4 mmol/L berechnet ($R^2 = 0,858$; $b = 4,8$; $EC_{10} = 26,1$ mmol/L). Für die Summe der subletalen Effekte nach 48 Stunden beträgt die $EC_{50 \text{ subletal}}$ 46,9 mmol/L ($b = 5,2$; $EC_{10} = 26,6$ mmol/L).

In 58,4 und 81,8 mmol/L wurden nach 48 Stunden Deformationen der Chorda und der Schwanzspitze festgestellt. In 81,8 mmol/L traten noch weitere Malformationen auf: nach 24 Stunden wurden zwei Spaltembryonen beobachtet, von denen einer innerhalb der folgenden 24 Stunden koagulierte. Der zweite wies nach 48 Stunden schwere Deformationen des nicht vom Dotter abgelösten Schwanzes auf und hatte noch keine Kopfanlage ausgebildet. Aus den konzentrationsabhängig auftretenden teratogenen Effekten nach 48 Stunden wurde eine $EC_{50 \text{ teratogen}}$ von 73,8 mmol/L errechnet ($R^2 = 0,972$; $b = 14,2$; $EC_{10} = 60,0$ mmol/L).

Tab. 29: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Diethylenglykoldimethylether auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	29,8	41,7	58,4	81,8	114,5
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	–	3	13
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	3/13	†
	48	–	–	–	–	1/12	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	2/13	†
	48	–	–	–	–	–	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	2/13	†
	48	–	–	–	–	1/12	†
kein Blutkreislauf	48	–	2	–	3	7/12	†
Dotteroedem	48	–	3	5	10	11/12	†
Perikardoedem	48	–	3	1	1	3/12	†

Fortsetzung Tab. 29

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	29,8	41,7	58,4	81,8	114,5
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	1	3/13	†
	48	–	–	–	1	4/12	†
Chordadeformation (Körper)	24	–	–	–	2	3/13	†
	48	–	–	–	2	3/12	†
keine Kopfanlage	24	–	–	–	–	1/13	†
	48	–	–	–	–	1/12	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	3/13	†
	48	–	–	–	–	3/12	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	1	2/13	†
	48	–	–	–	1	2/12	†
Spaltembryo	24	–	–	–	–	2/13	†
	48	–	–	–	–	1/12	†
Σ teratogen		0	0	0	3	8/12	†
Σ subletal		0	5	5	13	12/12	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguiert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

In einem der vorangegangenen Versuche wurde für die Reduktion der Schwanzlänge nach 120 Stunden eine NOEC / LOEC von 36,6 / 62,2 mmol/L ermittelt. In Abb. 20 sind die Schwanzlängen in den einzelnen Konzentrationen dargestellt.

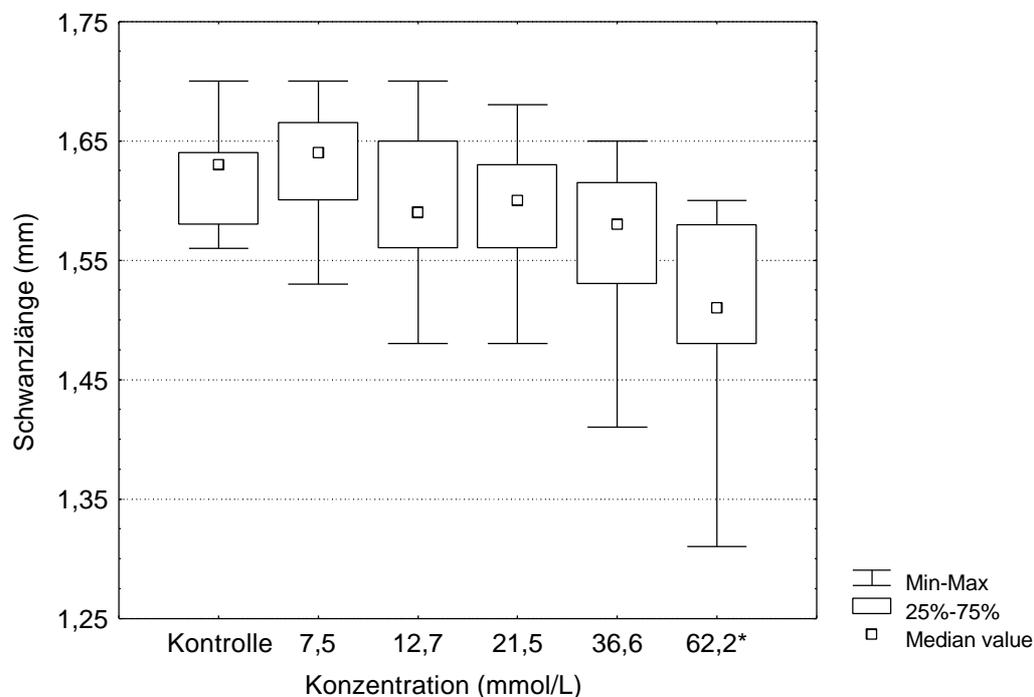


Abb. 20: Wirkung von Diethylenglykoldimethylether auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge: 36,6 / 62,2 mmol/L

Ab 36,6 mmol/L läßt sich eine konzentrationsabhängige Verkürzung der Schwanzlänge feststellen, die in 62,2 mmol/L signifikant war ($p = 0,05$). In dieser Konzentration streuen die Werte am weitesten.

Die berechneten EC_{50} , LC_{50} und $NOEC / LOEC$ sind in Tab. 30 zusammengestellt. Abb. 21 verdeutlicht den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die letalen und die teratogenen Effekte.

Tab. 30: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Diethylenglykoldimethylether

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	82,4 (78,3 – 86,8)
EC_{50} Oedeme	48	48,4 (41,5 – 56,5)
EC_{50} subletal	48	46,9 (40,1 – 55,2)
EC_{50} teratogen	48	73,8 (67,2 – 81,1)
$NOEC / LOEC$ reduzierte Schwanzlänge	120	36,6 / 62,2
TI		1,12

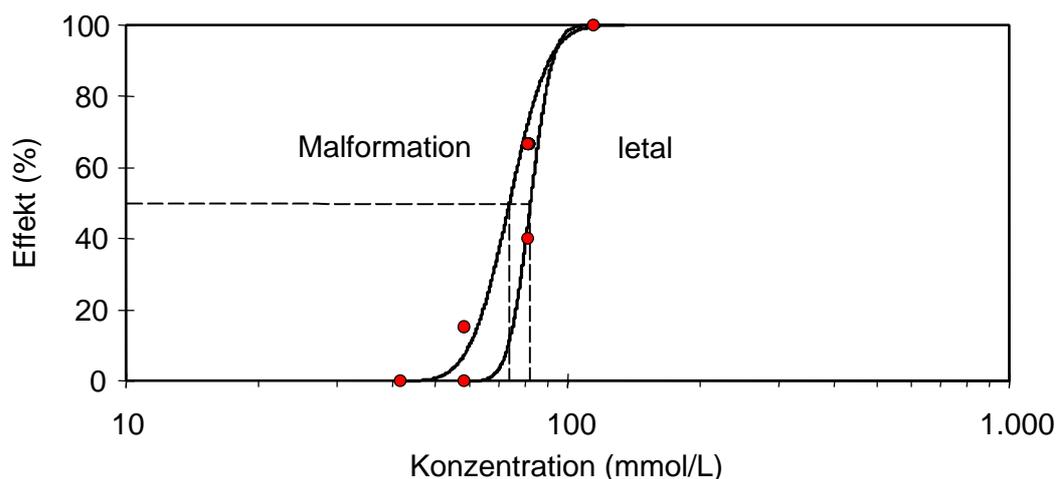


Abb. 21: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Diethylenglykoldimethylether für die teratogenen und letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 82,4 mmol/L; EC_{50} teratogen (48 h): 73,8 mmol/L

Obwohl auf der Abszisse zwei Größenordnungen aufgetragen sind, liegen die Sigmoiden für die letalen und teratogenen Effekte eng beieinander. Da die Konzentrations-Wirkungskurve für die letalen Effekte ($b = 25,5$) gegenüber der für die Malformationen ($b = 14,2$) steiler ansteigt, überschneiden sich beide Sigmoiden im obersten Bereich. Das bedeutet, daß in diesem Bereich mögliche Malformationen von den letalen Effekte überdeckt werden. Der aus dem Quotient der LC_{50} und der EC_{50} teratogen ermittelte TI von 1,12 verdeutlicht den schmalen Konzentrationsbereich, in dem diese Effekte auftraten. Obwohl teilweise von letalen Effekten überdeckt, wurden an den Embryonen von *D. rerio* teratogene Effekte nachgewiesen. Im *DarT* zeigte sich für Diethylenglykoldimethylether ein teratogenes Potential. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.8.1.5 (Seite 67) dargestellt.

3.8.1.2 2-Methoxyethanol

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde 2-Methoxyethanol in folgenden Konzentrationen untersucht: 131,4; 184,0; 257,6; 360,6 und 504,8 mmol/L. Sauerstoffsättigung und pH-Werte im Kontrollmedium und in den Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Für die Osmolarität wurden Werte von 145 bis 549 mOsmol/L bestimmt. Die Meßwerte sind in Tab. A 23 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da in den Kontrollen nicht mehr als 5 % der Embryonen Effekte aufwiesen (siehe Tab. 31 und Tab. 32).

Die Anzahl der koagulieren Embryonen ist in Tab. 31 zusammengestellt. Die nach 48 Stunden berechnete LC_{50} beträgt 313,2 mmol/L ($R^2 = 0,995$; $b = 17,0$; $LC_{10} = 263,2$ mmol/L).

Tab. 31: Zusammenstellung der letalen Effekte von 2-Methoxyethanol

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	131,4	184,0	257,6	360,6	504,8
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	1	11	20
	48	–	–	–	1	16	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die durch 2-Methoxyethanol innerhalb von 48 Stunden verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 32 zusammengestellt. Bereits nach 2,5 Stunden wird eine frühzeitige Störung der Embryonalentwicklung deutlich. Ab 257,6 mmol/L hatten 15 % bzw. 95 % der Embryonen noch keine hohe Blastula angelegt bzw. Bläschen an den Blastomeren abgeschnürt. Die Werte, die in den einzelnen Konzentrationen für die Osmolarität gemessen wurden, liegen über der von Lange et al. (1995) genannten Grenze von 100 mOsmol/L und lassen osmotischen Effekte an den Embryonen erwarten. Vermutlich waren die Störungen der frühen Ontogenese in den hohen Konzentrationen auf durch 2-Methoxyethanol verursachte osmotische Effekte zurückzuführen. Die meisten Embryonen, die diese frühen Effekte aufwiesen, starben im Verlaufe des Testes ab. Nur vier dieser Embryonen in 360,6 mmol/L wurden nach 48 Stunden noch nicht als tot bewertet. Sie ließen ein großes Spektrum subletaler Effekte erkennen, die von fehlenden Somiten bzw. Organanlagen, über gestörten Blutkreislauf und Dotterödeme bis hin zu stark ausgeprägten Malformationen reichten (siehe unten).

Vor allem in 257,6 und 360,6 mmol/L läßt sich die Entwicklungsstörung an der fehlenden Spontanbewegung, verzögerten Augenentwicklung und Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems erkennen. Die größte Wirkung zeigte sich bei der Herzschlagfrequenz. Diese war bereits ab der geringsten untersuchten Konzentration von 131,4 mmol/L signifikant reduziert ($p = 0,05$). In Abb. 22 ist die konzentrationsabhängige Abnahme der Herzschläge dargestellt. Drei Embryonen (75 %) in 360,6 mmol/L bildeten keine Melanocyten aus, was auf die starke allgemeine Schädigung dieser Embryonen zurückzuführen war. Für die gesamten subletalen Effekte nach 48 Stunden beträgt die EC_{50} subletal 204,9 mmol/L (Berechnung nach "Trimmed Spearman-Kärber").

Tab. 32: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 2-Methoxyethanol auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	131,4	184,0	257,6	360,6	504,8
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	1	19	19
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	2	1	1
Gastrulation nicht beendet	24	–	–	–	–	7/9	†
	48	–	–	–	–	1/4	†
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	9/19	2/9	†
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	–	1/4	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	7/19	1/9	†
	48	–	–	–	–	1/4	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	2/19	–	†
	48	–	–	–	–	–	†
kein Herzschlag	48	–	–	–	2/19	2/4	†
schwacher Blutkreislauf	48	1	–	2	1/19	–	†
kein Blutkreislauf	48	–	–	–	18/19	3/4	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	18/19	–	†
keine Pigmentierung	48	–	–	–	–	3/4	†
Dotterödem	48	1	–	2	11/19	2/4	†
Perikardoedem	48	–	–	2	7/19	–	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	5/19	–	†
	48	–	–	–	5/19	1/4	†
Chordadeformation (Körper)	24	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	1/19	–	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	7/19	2/9	†
	48	–	–	–	5/19	3/4	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	1/19	–	†
	48	–	–	–	3/19	2/4	†
Spaltembryo	24	–	–	–	–	2/9	†
	48	–	–	–	–	–	†
Σ teratogen		0	0	0	10/19	3/4	†
Σ subletal		1	0	4	19/19	4/4	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koagulierte; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

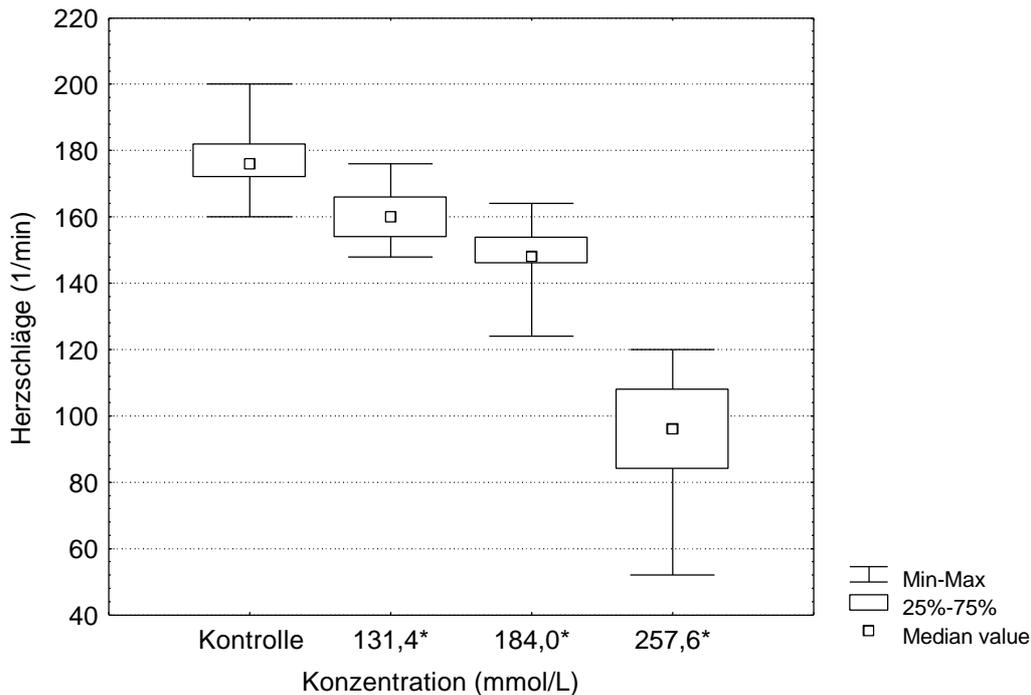


Abb. 22: Wirkung von 2-Methoxyethanol auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC_{reduzierte Herzschlagfrequenz}: - / 131,4 mmol/L

Zahlreiche Malformationen wurden in 257,6 und 360,6 mmol/L beobachtet. Nach 48 Stunden traten vor allem Deformationen des Schwanzes, der Schwanzspitze und der Chorda auf. In 257,6 mmol/L waren zehn (52,6 %) und in 360,6 mmol/L drei Embryonen (75 %) davon betroffen. Der vierte, noch nicht koagulierte Embryo in 360,6 mmol/L hatte bis zu diesem Zeitpunkt die Gastrulation nicht beendet und ließ keine Entwicklung von Organanlagen erkennen. Nach 24 Stunden wurden in 360,6 mmol/L zwei Spaltembryonen beobachtet. Beide wiesen eine deutliche Medianspalte auf. Einer koagulierte innerhalb der folgenden 24 Stunden. Bei dem zweiten Embryo konnte der Effekt nach 48 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden. Eine vergleichbare Beobachtung machten auch Sander & Baumann (1983). Die dorsal getrennten Längshälften des Körpers können in der weiteren Entwicklung zusammengezogen werden, ohne miteinander zu verwachsen. Sie sind dann nicht mehr als offene Medianspalte zu erkennen. Für die teratogenen Effekte beträgt die EC_{50} nach 48 Stunden 267,2 mmol/L ($b = 11,4$; $EC_{10} = 206,2$ mmol/L).

Da es nach 48 Stunden ein Hinweis auf Wachstumsreduktion gab, wurden die Embryonen in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Die beobachteten Effekte sind in Tab. 33 zusammengestellt.

Tab. 33: Zusammenstellung der Effekte von 2-Methoxyethanol auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 h

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	131,4	184,0	257,6	360,6	504,8
koaguliert ^a	120	–	1	2	14	20	20
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	120	–	–	–	2/6	†	†
deformierte Schwanzspitze	120	–	–	–	1/6	†	†
Σ teratogen		0	0	0	2/6	†	†
Σ subletal		0	0	0	2/6	†	†

Anzahl der Larven je „Konzentration“ n = 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : koagulierte und nicht geschlüpfte Embryonen zusammengefaßt

In 360,6 mmol/L waren alle Embryonen koaguliert. Die nicht geschlüpfen Embryonen in den drei darunterliegenden Konzentrationen wurden als tot gewertet, da sie sich bereits in Lyse befanden. Die LC_{50} (120 h) beträgt 226,6 mmol/L ($b = 9,8$; $LC_{10} = 167,7$ mmol/L) und liegt damit ca. 28 % unterhalb der LC_{50} (48 h). Durch die Verlängerung der Testdauer ergab sich nach Beendigung der Exposition für 2-Methoxyethanol ein Hinweis auf verzögert auftretende letale Effekte. Da die meisten Embryonen in 257,6 und 360,6 mmol/L abgestorben waren, konnten nur noch zwei Larven (33,3 %) mit Malformationen beobachtet werden. Sie wiesen eine Deformation der Chorda bzw. der Schwanzspitze auf. Die Berechnung einer EC_{50} war bei dieser Datenlage nicht möglich. Wird die Schwanzlänge der Larven mit in die Betrachtung einbezogen, ergibt sich folgendes Bild (Abb. 23): in allen drei Konzentrationen war die Schwanzlänge im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert ($p = 0,05$). Es besteht eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit. Die LOEC für die reduzierte Schwanzlänge nach 120 Stunden ist etwa halb so groß wie die EC_{50} teratogen nach 48 h.

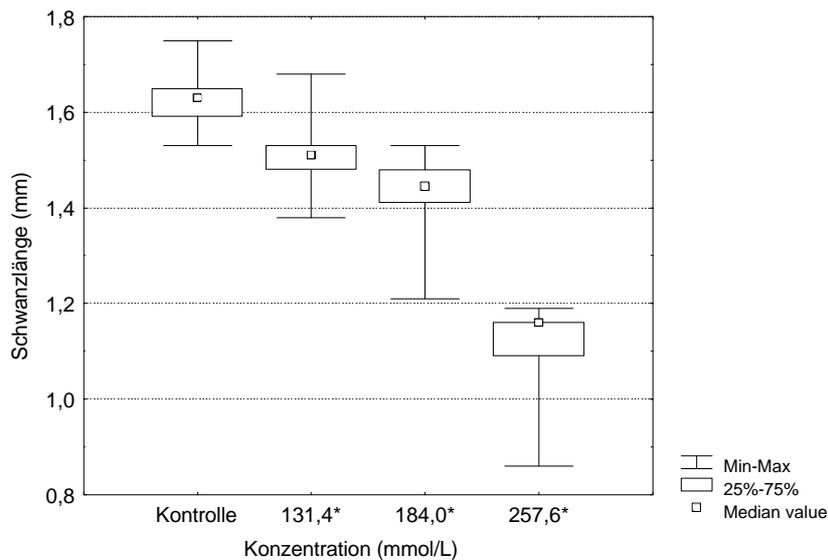


Abb. 23: Wirkung von 2-Methoxyethanol auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge: – / 131,4 mmol/L

In Tab. 34 sind die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC / LOEC zusammengestellt und Abb. 24 zeigt den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für teratogene und letale Effekte.

Tab. 34: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 2-Methoxyethanol

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	313,2 (292,3 – 335,5)
LC_{50}	120	226,6 (205,4 – 249,9)
EC_{50} subletal	48	204,9 (193,4 – 217,1)
EC_{50} teratogen	48	267,2 (242,2 – 320,4)
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	– / 131,4
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	– / 131,4
TI		1,17

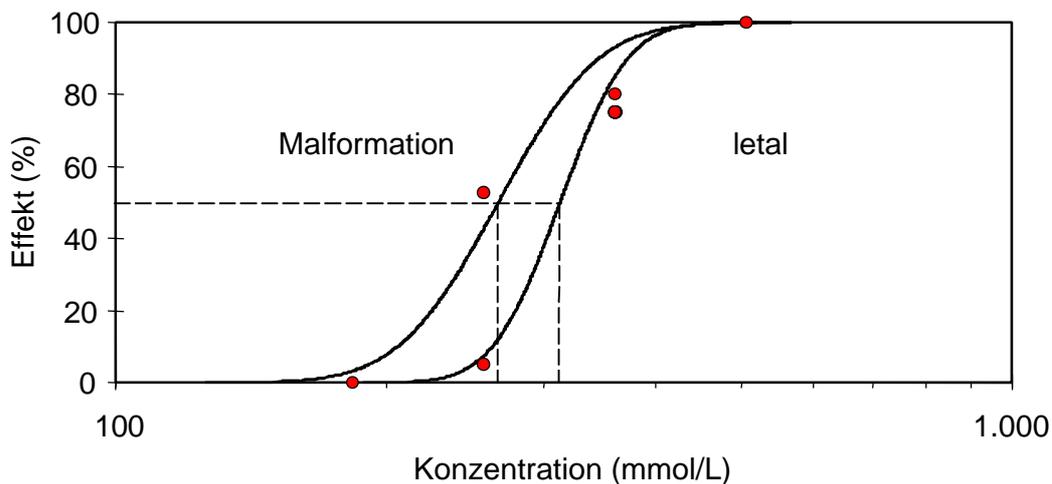


Abb. 24: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von 2-Methoxyethanol für die teratogenen und die letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 313,2 mmol/L; EC_{50} teratogen (48 h): 267,2 mmol/L

Beide Sigmoiden sind im mittleren und unteren Bereich deutlich voneinander getrennt. Bedingt durch den flacheren Verlauf der Kurve für die Malformationen laufen sie im oberen Bereich zusammen. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven liegen eng beieinander. Es ist zu beachten, daß die Abszisse nur eine Zehnerpotenz umfaßt. Teratogene und letale Effekte wurden also im selben Konzentrationsbereich beobachtet, was auch durch den TI von 1,17 wiedergegeben wird. Der empfindlichste Endpunkt war die Reduktion der Schwanzlänge. Dessen LOEC war um den Faktor 2 kleiner als die EC_{50} teratogen und um den Faktor 1,4 kleiner als die höchste Konzentration, in der keine teratogenen Effekte auftraten.

Das Auftreten starker teratogener Effekte (Spaltembryo nach 24 Stunden) in den durchgeführten Testen und die Trennung im überwiegenden Verlauf der beiden Sigmoiden weisen darauf hin, daß die Embryonen von *Danio rerio* in der Lage sind, diese Substanz in gewissem Maße metabolisch zu aktivieren (siehe 3.8.1.5, Seite 67). Obwohl teratogene und

letale Wirkungen relativ eng beieinander lagen, ließ 2-Methoxyethanol im *DarT* ein teratogenes Potential erkennen. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.8.1.5 (Seite 67) dargestellt.

3.8.1.3 Methoxyessigsäure

Nach Vorversuchen wurde Methoxyessigsäure in folgenden Konzentrationen untersucht: 111, 189, 321, 545 und 927 $\mu\text{mol/L}$. Sauerstoffsättigung und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. In 545 und 927 $\mu\text{mol/L}$ lag der pH-Wert zu Beginn des Testes unter 4,5. Eine Beeinträchtigung der Embryonen kann in diesen beiden höchsten Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden. Die Meßwerte sind in Tab. A 21 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da bei den Kontrollen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 35 und Tab. 36).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 35 zusammengefaßt. Bereits nach acht Stunden waren ab 321 $\mu\text{mol/L}$ Embryonen koaguliert. Deren Anzahl erhöhte sich in den drei höchsten Konzentrationen bis zum Meßzeitpunkt nach 24 Stunden. Danach starben keine weiteren Embryonen ab. Nach 24 bzw. 48 Stunden läßt sich eine LC_{50} von 596 $\mu\text{mol/L}$ berechnen ($R^2 = 0,989$; $b = 5,0$; $\text{LC}_{10} = 332 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 35: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methoxyessigsäure

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	111	189	321	545	927
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	1	4/19	10
	24	–	–	–	2	7/19	17
	48	–	–	–	2	7/19	17

In den Kontrollen, 111 $\mu\text{mol/L}$ und 545 $\mu\text{mol/L}$ wurden 19 Embryonen eingesetzt, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die durch Methoxyessigsäure verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 36 aufgeführt. In den drei höchsten Konzentrationen traten Embryonen auf, deren frühe Furchungsstadien gestört waren und die Bläschen an den Blastomeren bzw. am Dotter abgeschnürt hatten. Das betraf in 321 $\mu\text{mol/L}$ drei Embryonen (15 %), in 545 $\mu\text{mol/L}$ neun Embryonen (47,4 %) und in 927 $\mu\text{mol/L}$ zehn Embryonen (50 %). Da die Osmolarität unterhalb der Nachweisgrenze von 4 mOsmol/L lag, wurden diese Effekte vermutlich durch den niedrigen pH-Wert in diesen Konzentrationen verursacht. Ein Teil dieser Embryonen starb innerhalb der folgenden sechs Stunden ab. In 545 $\mu\text{mol/L}$ und 927 $\mu\text{mol/L}$ wurden noch nach acht Stunden bei jeweils vier Embryonen (26,7 bzw. 40 %) abgeschnürte Bläschen festgestellt. Für die funktionale Störung „keine Spontanbewegung“ nach 24 Stunden konnte eine EC_{50} von 456 $\mu\text{mol/L}$ berechnet werden ($R^2 = 0,921$; $b = 1,2$; $\text{LC}_{10} = 42 \mu\text{mol/L}$). Aufgrund der Datenlage besteht für diesen Wert ein sehr weiter Vertrauensbereich (siehe Tab. 37), so daß er kritisch zu bewerten ist.

Bei den Endpunkten „Schwanz nicht abgelöst“ und „diffuse Augenanlage“ läßt sich nach 24 Stunden bei einzelnen Embryonen eine Entwicklungsverzögerung erkennen. Nach 48 Stunden traten vereinzelt Dotteroedeme auf. Aus der Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden

subletale Effekte aufwiesen, ergibt sich keine sinnvolle EC_{50} subletal. Sie würde mit $812 \mu\text{mol/L}$ weit über der LC_{50} (48 h) liegen.

Tab. 36: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methoxyessigsäure auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	111	189	321	545	927
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	1	7/19	9
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	3	5/19	5
	8	–	–	–	–	4/15	4/10
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	8/18	6/12	2/3
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	1/18	1/12	2/3
	48	–	–	–	–	–	–
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	1/18	–	1/3
	48	–	–	–	–	–	–
kein Blutkreislauf	48	–	–	–	–	–	1/3
Dotteroedem	48	–	1/19	–	–	1/12	1/3
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	1/12	1/3
	48	–	–	–	–	–	1/3
Veränderung des Dotters	2,5	–	–	–	–	4/19	11
	8	–	–	–	–	5/15	6/10
Σ teratogen		0	0	0	0	0	1/3
Σ subletal		0	1/19	0	0	1/12	2/3

In den Kontrollen, $111 \mu\text{mol/L}$ und $545 \mu\text{mol/L}$ wurden 19 Embryonen eingesetzt, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Nach 2,5 und acht Stunden wurde bei 21,1 bis 60 % der Embryonen in den beiden höchsten Konzentrationen eine „Verformung“ des Dotters beobachtet. 36,4 % dieser Embryonen starben bis zum Ende des Testes ab. Bei den übrigen trat dieser Effekt ab 24 Stunden nicht mehr auf. Eine Deformation der Chorda wurde nach 24 Stunden bei je einem Embryo in $545 \mu\text{mol/L}$ (8,3 %) und $927 \mu\text{mol/L}$ (33,3 %) beobachtet. Bei dem Embryo in $545 \mu\text{mol/L}$ konnte dieser Befund nach 48 Stunden nicht bestätigt werden. Weitere Malformationen wurden nicht festgestellt.

In einem Vorversuch wurden Konzentrationen von $33 - 167 \mu\text{mol/L}$ untersucht. Im gesamten Verlauf des Testes traten keine nennenswerten Effekte auf. Nach 48 Stunden fand sich in den Konzentrationen von $33 \mu\text{mol/L}$ und $74 \mu\text{mol/L}$ je ein Embryo mit Dotter- bzw. Perikardoedem. Um aber die Wirkung der Substanz auf das Längenwachstum beurteilen zu können, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Es traten weder letale noch subletale Effekte auf. Allein die Schwanzlänge der Larven war konzentrationsabhängig reduziert (siehe Abb. 25).

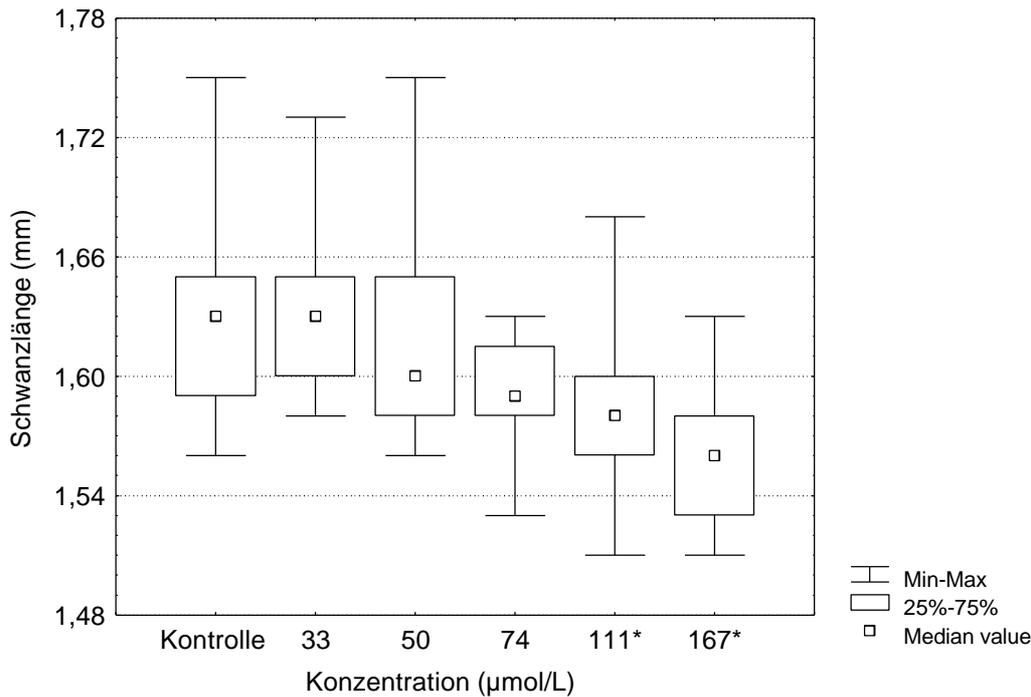


Abb. 25: Wirkung von Methoxyessigsäure auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge: 74 / 111 µmol/L

Die Schwanzlängen in 33 µmol/L sind gegenüber der Kontrolle nicht reduziert. Ab 50 µmol/L nehmen die Werte konzentrationsabhängig ab. Die Reduktion ist ab 111 µmol/L signifikant ($p = 0,05$). Auffällig sind die großteils weiten Streuungen der Werte, sowohl in den Konzentrationen als auch in der Kontrolle. Die berechneten LC₅₀, EC₅₀ bzw. NOEC / LOEC sind in Tab. 37 zusammengestellt.

Tab. 37: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methoxyessigsäure

	Zeit (h)	µmol/L
LC ₅₀	48	596 (501 – 709)
EC ₅₀ Spontanbewegung	24	456 (202 – 1.026)
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	74 / 111

Eine Deformation der Chorda wurde nach 48 Stunden nur an einem der drei lebenden Embryonen in 927 µmol/L nachgewiesen. In dieser Konzentration überwogen die letalen Effekte. Auch in niedrigeren Konzentrationen traten nur sehr wenige allgemein toxische (subletale) Effekte auf. Ein Wert für den Teratogenitätsindex TI konnte nicht berechnet werden. Der empfindlichste Endpunkt war die Schwanzlänge der Larven nach 120 Stunden. Diese war ab 111 µmol/L signifikant ($p = 0,05$) reduziert. Diese Konzentration liegt um den Faktor 2,9 niedriger als die geringste Konzentration, in der letale Effekte auftraten. Methoxyessigsäure verursachte im eindeutig subletalen Konzentrationsbereich eine Reduzierung des Längenwachstums. Das belegt, daß das säugerteratogene Potential dieser

Substanz auch im Test mit den Embryonen von *D. rerio* nachgewiesen werden konnte. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.8.1.5 (Seite 67) dargestellt.

3.8.1.4 Methoxyessigsäureisopropylester

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurde Methoxyessigsäureisopropylester in den Konzentrationen 35, 49, 69, 97 und 135 $\mu\text{mol/L}$ untersucht. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 22 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da bei den Kontrollembryonen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 38 und Tab. 39). Die während des Testes festgestellten letalen Effekte sind in Tab. 38 aufgeführt. Nach 24 Stunden waren in der höchsten untersuchten Konzentration 35 % der Embryonen koaguliert. Nach 48 Stunden befanden sich in 69 $\mu\text{mol/L}$ vier koagulierte Embryonen (20 %), ab 97 $\mu\text{mol/L}$ waren alle abgestorben. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verläuft steil. Mittels "Spearman-Kärber" Methode wurde eine LC_{50} (48 h) von 76 $\mu\text{mol/L}$ berechnet.

Tab. 38: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methoxyessigsäureisopropylester

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	35	49	69	97	135
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	–	7
	48	–	–	–	4	20	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die von Methoxyessigsäureisopropylester verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 39 zusammengestellt. Nach 24 Stunden hatten in 97 $\mu\text{mol/L}$ fünf Embryonen (25 %) und in 135 $\mu\text{mol/L}$ alle noch lebenden 13 Embryonen die Gastrulation nicht beendet. Nachdem die übrigen 15 Embryonen (75 %) in 97 $\mu\text{mol/L}$ den Blastoporus verschlossen hatten, entwickelten sie sich nicht weiter. Sie legten weder Somiten an, noch entwickelten sie eine Kopf- oder Schwanzanlage und starben innerhalb der folgenden 24 Stunden ab. Spontanbewegung wurde nach 24 Stunden bei den Kontrollen und bei vier Embryonen (20 %) der geringsten Konzentration festgestellt. Alle anderen noch lebenden Embryonen zeigten keine Bewegungsaktivität. Werden die Ablösung des Schwanzes vom Dotter und die Entwicklung der Augen nach 24 und 48 Stunden miteinander verglichen, läßt sich eine Entwicklungsverzögerung erkennen. Herzschlag und Blutkreislauf waren nach 48 Stunden in 35 $\mu\text{mol/L}$ bei 55 % und in 49 bzw. 69 $\mu\text{mol/L}$ bei allen Embryonen gestört. Oedeme an Dotter und Perikard traten bei elf Embryonen (55 %) in 35 $\mu\text{mol/L}$ bzw. bei 19 Embryonen (95 %) in 49 $\mu\text{mol/L}$ auf. In 69 $\mu\text{mol/L}$ wurden keine Oedeme beobachtet. Vier Embryonen (20 %) in 35 $\mu\text{mol/L}$ hatten keine Melanocyten gebildet und sieben weitere (35 %) zeigten eine nur sehr schwache Pigmentierung. In 49 und 69 $\mu\text{mol/L}$ fehlte allen lebenden Embryonen die Pigmentierung. Aufgrund der Datenlage konnte für die subletalen Effekte keine EC_{50} berechnet werden. In der geringsten untersuchten Konzentration von 35 $\mu\text{mol/L}$ wiesen 85 %

der Embryonen, ab 49 $\mu\text{mol/L}$ alle lebenden Embryonen subletale Effekte auf. Die EC_{50} subletal (48 h) muß also deutlich unter 35 $\mu\text{mol/L}$ liegen.

Tab. 39: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methoxyessigsäureisopropylester auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	35	49	69	97	135
Gastrulation nicht beendet ^a	24	–	–	–	–	5	13/13
keine Spontanbewegung	24	–	16	20	20	–	–
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	6	15	–
	48	–	–	–	4/16	†	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	17	19	–	–	–
	48	–	12	20	4/16	†	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	1	20	–	–
	48	–	–	–	11/16	†	†
diffuse Augenanlage	24	–	13	15	2	–	–
	48	–	12	18	3/16	†	†
keine Augenanlage	24	–	1	5	18	–	–
	48	–	–	2	13/16	†	†
kein Herzschlag	48	–	5	19	16/16	†	†
kein Blutkreislauf	48	–	11	20	16/16	†	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	7	–	–	†	†
keine Pigmentierung	48	–	4	20	16/16	†	†
Dotteroedem	48	–	9	19	–	†	†
Perikardoedem	48	–	6	5	–	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	1	–	–	–
	48	–	–	–	2/16	†	†
keine Kopf- und Schwanzanlage	24	–	–	–	–	15	–
	48	–	–	–	–	†	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	7	20	1/16	†	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	2/16	†	†
Sacculi nicht angelegt	48	–	8	20	16/16	†	†
Σ teratogen		0	9	20	16/16	†	†
Σ subletal		0	17	20	16/16	†	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : Epibolie zu $\frac{3}{4}$ stattgefunden

Bei einem Embryo (5 %) in 35 $\mu\text{mol/L}$ wurde nach 24 Stunden die Deformation der Chorda festgestellt, die aber nach 48 Stunden nicht bestätigt werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt wiesen in 69 $\mu\text{mol/L}$ zwei Embryonen (12,5 %) diesen Effekt auf. Eine Deformation des Schwanzes wurde bei sieben (35 %) Embryonen in 35 $\mu\text{mol/L}$ verursacht, ebenso bei allen in

49 $\mu\text{mol/L}$ und bei einem (6,2 %) in 69 $\mu\text{mol/L}$. Dieser und ein weiterer Embryo (12,5 %) hatten eine deformierte Schwanzspitze. Acht Embryonen (40 %) in 35 $\mu\text{mol/L}$ hatten weder Sacculi noch Otolithen entwickelt; in 49 und 69 $\mu\text{mol/L}$ betraf das zu diesem Zeitpunkt alle lebenden Embryonen. Aus den teratogenen Effekten ließ sich mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode eine $\text{EC}_{50 \text{ teratogen}}$ (48 h) von 36 $\mu\text{mol/L}$ berechnen. Aufgrund der massiven Schädigung der Embryonen wurde der Test nicht auf 120 Stunden verlängert. In Tab. 40 sind die berechneten Werte zusammengestellt.

Tab. 40: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methoxyessigsäureisopropylester

	Zeit (h)	$\mu\text{mol/L}$
LC_{50}	48	76 (72 – 81)
$\text{EC}_{50 \text{ teratogen}}$	48	36
TI		2,11

Teratogene Effekte wurden bereits in einem Konzentrationsbereich verursacht, in dem keine letalen Effekte auftraten (35 und 49 $\mu\text{mol/L}$). Diese deutliche Trennung wird auch aus dem relativ großen Abstand zwischen $\text{EC}_{50 \text{ teratogen}}$ und LC_{50} ersichtlich. Der daraus resultierende Teratogenitätsindex TI beträgt 2,11. Bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* wurde für Methoxyessigsäureisopropylester ein teratogenes Potential erkannt. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.8.1.5 dargestellt.

3.8.1.5 Diethylenglykoldimethylether und Metabolite – zusammenfassende Betrachtung

Diethylenglykoldimethylether wird von Säugetieren metabolisiert. Obwohl bei der Ratte 2-Methoxyethoxyessigsäure als Hauptmetabolit entsteht, wird Diethylenglykoldimethylether ebenfalls über 2-Methoxyethanol bis hin zur Methoxyessigsäure metabolisiert (Cheever et al., 1989). Methoxyessigsäure wurde auch bei der Maus nach Verabreichung von Diethylenglykoldimethylether als ein Hauptmetabolit identifiziert (BUA 67, 1992). Sie gilt als verantwortlich für das Auslösen teratogener Effekte (Daniel et al., 1991) und reichert sich in der Extraembryonalflüssigkeit der Gebärmutter stark an (Scott et al., 1987). Daß 2-Methoxyethanol mittels Alkoholdehydrogenase zu Methoxyessigsäure metabolisiert wird, konnten Ritter et al. (1985) bei Untersuchungen an Ratten zeigen. Der Anteil mißgebildeter Embryonen verringerte sich um 90 %, wenn zusätzlich zu 2-Methoxyethanol ein Alkoholdehydrogenase-Hemmer (4-Methylpyrazol) appliziert wurde.

In Abb. 26 sind die möglichen Metabolismuswege von Diethylenglykoldimethylether und 2-Methoxyethanol schematisch dargestellt. Es wurden nur die Metabolite berücksichtigt, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind. Dies stellt keine quantitative Einschätzung dar.

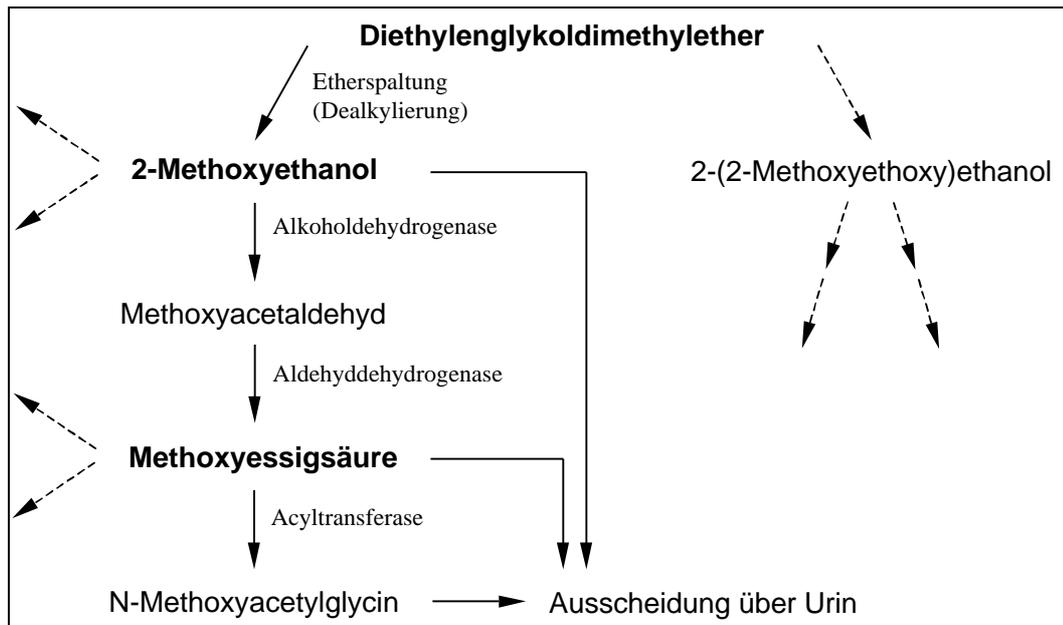


Abb. 26: Metabolismus von Diethylenglykol und 2-Methoxyethanol bei Ratte und Maus

Es wurden Metabolite berücksichtigt, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Dies stellt keine quantitative Einschätzung dar (nach BUA 198, 1997 und Cheever et al. 1988, verändert).

Diethylenglykoldimethylether verursacht im Tierversuch teratogene Effekte bei nicht maternaltoxischen Dosierungen. 0,46 – 3,73 mmol/kg/Tag der Substanz wurde Mäusen via Schlundsonde vom 6. bis 15. Gestationstag verabreicht. Maternaltoxizität trat nicht auf, ab 0,93 mmol/kg wurden zunehmend fetotoxische Effekte verursacht. Spezifische teratogene Effekte wurden nicht beobachtet. Hauptsächlich wurden Mißbildungen am Neuralrohr, den Gliedmaßen und dem Skelettsystem beobachtet. Weiterhin fanden sich Effekte des Gesichtsschädels sowie des Kardiovaskular- und Urogenitalsystems. 54 % der mißgebildeten Feten aus der höchstdosierten Gruppe wiesen Rippenverschmelzung und Exenzephalie auf (Price et al., 1987).

Hardin & Eisenmann (1987) verabreichten Mäusen am 11. Gestationstag 4,0 mmol/kg Diethylenglykoldimethylether und fanden keine maternaltoxischen Effekte. Bei 40 % der Feten wurden Mißbildungen der Pfoten (Syndaktylie, Oligodaktylie und verkürzte Zehen) festgestellt.

Beim Kaninchen wurden nach Verabreichung von 0,37 bis 1,30 mmol/kg (6. – 19. Gestationstag) Mißbildungen der Gliedmaßen, des Skeletts, des Kreislaufsystems sowie innerer Organe an 12 – 51 % der lebenden Feten festgestellt. In der höchstdosierten Gruppe traten 15 % maternaltoxische Effekte auf (Price et al., 1988).

Durch 2-Methoxyethanol verursachte teratogene Effekte sind bei Ratte, Maus und Kaninchen beschrieben. Nach oraler bzw. intraperitonealer Applikation von 2,07 und 4,14 mmol/kg (12. Gestationstag) wurden bei den Feten Hydronephros, Herzdefekte sowie Verkürzung von Gliedmaßen und Schwanz beobachtet. In 2,07 mmol/kg waren 45,2 % (oral) bzw. 62,8 % (ipr.) und in 4,14 mmol/kg 100 % (oral und ipr.) der lebenden Feten mißgebildet. Gleichzeitig traten vermehrt tote bzw. resorbierte Feten auf. Spezielle Mißbildungen des Herzens und ventrale Polydaktylie wurden als spezifische Effekte beschrieben, die allgemein sehr selten auftreten (Ritter et al., 1985).

Untersuchungen an *Macaca fascicularis* ergaben embryotoxische Effekte von 2-Methoxyethanol. Zwischen Gestationstag 20 und 45 wurden via Schlundsonde täglich 0,16, 0,32 und 0,47 mmol/kg appliziert. In der höchstdosierten Gruppe waren alle, in der mittleren 36 % und in der am geringsten dosierten Gruppe 29 % der Embryonen abgestorben. Keiner der lebenden Embryonen (Gestationstag 100) ließ Mißbildungen erkennen (Scott et al., 1989).

Durch 2-Methoxyethanol verursachte Neuralrohrdefekte bei Mausembryonen (3,29 – 4,27 mmol/kg, subkutan, 8. Gestationstag) werden von Terry et al. (1996) beschrieben. Ebenfalls bei Mäusen wurden nach oraler Applikation von 3,3 und 4,6 mmol/kg 2-Methoxyethanol (11. Gestationstag) an 47 bzw. 94 % der Feten Zehenmißbildungen verursacht (Welsch et al., 1987).

In dieser Studie wurden, ebenfalls an Mäusen, vergleichbare Effekte durch Methoxyessigsäure verursacht. 52 % der Feten aus der mit 3,4 mmol/kg behandelten Gruppe wiesen Zehenmißbildungen auf. Ritter et al. (1985) verabreichten Ratten 2,07 bzw. 4,14 mmol/kg Methoxyessigsäure (oral, 12. Gestationstag). Bis zum Gestationstag 20 waren 15 bzw. 54 % der Feten abgestorben und teilweise resorbiert. 53 bzw. 99 % der lebenden Feten wiesen Hydronephros, Herzdefekte sowie Verkürzungen von Gliedmaßen und Schwanz auf.

Methoxyessigsäure entsteht als Hydrolyseprodukt aus Methoxyessigsäureisopropylester und stellt vermutlich das eigentliche Teratogen dar (Jäckh – persönliche Mitteilung, 2002). Es muß davon ausgegangen werden, daß sich entsprechend entwicklungsschädigende Wirkungen ergeben (BASF, 1999).

Sowohl Diethylenglykoldimethylether als auch 2-Methoxyethanol, Methoxyessigsäure und Methoxyessigsäureisopropylester verursachten an den Embryonen von *D. rerio* teratogene Effekte, die in Tab. 41 (phänomenologisch) zusammengestellt sind.

Tab. 41: Phänomenologische Zusammenfassung der im *DarT* beobachteten teratogenen Effekte

Effekt	Diglyme	2-Methoxyethanol	MAA	MAA-isopropylester
Chordadeformation	●	●	●	●
Schwanzdeformation	●	●		●
Schwanzspitze	●	●		●
fehlende Kopfanlage	●			
Spaltembryo	●	● ^a		
Sacculi nicht angelegt				●
reduzierte Schwanzlänge	●	●	●	nicht untersucht

Diglyme : Diethylenglykoldimethylether; MAA : Methoxyessigsäure; MAA-isopropylester : Methoxyessigsäureisopropylester; a : nach 24 Stunden beobachtet

Deformationen der Chorda und des Schwanzes wurden von Diethylenglykoldimethylether und 2-Methoxyethanol verursacht. Beide Substanzen verursachten einzelne Spaltembryonen, wobei dieser Effekt bei 2-Methoxyethanol nur nach 24 Stunden zu beobachten war. Für beide Substanzen sind Neuralrohrdefekte auch beim Säuger beschrieben (Price et al., 1987; Terry et

al., 1996). Diethylenglykoldimethylether verursachte im *DarT* bei einem Embryo eine fehlende Kopfanlage.

Für Methoxyessigsäure wurde nur an einem Embryo eine Chordadeformation beobachtet. Alle drei Substanzen bewirkten aber eine Reduzierung des Längenwachstums.

Methoxyessigsäureisopropylester verursachte ein ähnlich weites Spektrum an Deformationen der Chorda und des Schwanzes, aber keine Spaltembryonen. Allein bei dieser Substanz wurde die Entwicklung der Sacculi samt Otolithen beeinträchtigt. In Tab. 42 sind für die vier Substanzen die im *DarT* ermittelten Wirkkonzentrationen vergleichend dargestellt.

Tab. 42: Zusammenstellung von EC_{50} teratogen (48 h) und $LOEC$ reduzierte Schwanzlänge (120 h)

	EC_{50} teratogen (mmol/L)	$LOEC$ reduzierte Schwanzlänge (mmol/L)
Diethylenglykoldimethylether	73,8	62,2
2-Methoxyethanol	267,2	131,4
Methoxyessigsäure	0,927 ^a	0,111
Methoxyessigsäureisopropylester	0,036	–

a : 1/3 der lebenden Embryonen hatte Chordadeformation; – : nicht ermittelt

Für 2-Methoxyethanol wurde sowohl die höchste EC_{50} teratogen als auch die höchste $LOEC$ für die Reduktion der Schwanzlänge berechnet. Die Werte lagen um das zwei- bis vierfache über den entsprechenden Wirkkonzentrationen von Diethylenglykoldimethylether.

Auffällig ist der große Unterschied zwischen den Werte für Methoxyessigsäure und Methoxyessigsäureisopropylester und den beiden erst genannten Substanzen. Für die reduzierte Schwanzlänge liegt die $LOEC$ von Methoxyessigsäure um den Faktor 560 bzw. über 1.180 unter denen von Diethylenglykoldimethylether bzw. 2-Methoxyethanol. Nicht ganz so große Faktoren ergeben sich beim Vergleich der EC_{50} teratogen, wobei für Methoxyessigsäure keine EC_{50} berechnet werden konnte. Als Vergleich dient die Konzentration von 0,927 mmol/L, in der einer von drei lebenden Embryonen eine Chordadeformation aufwies (33,3 %). Unter Berücksichtigung dieser Einschränkung ergeben sich hier Faktoren zwischen 80 und 288. Für Methoxyessigsäureisopropylester konnte nur eine EC_{50} teratogen angegeben werden. Diese liegt nochmals um den Faktor 26 unter dem Vergleichswert für Methoxyessigsäure.

Wird die Wirksamkeit von Diethylenglykoldimethylether, 2-Methoxyethanol und Methoxyessigsäure hinsichtlich der Auslösung teratogener Effekte beim Säuger verglichen, dann ergibt sich keine so deutliche Ordnung. Beispielhaft seien hier Werte aus verschiedenen Untersuchungen (Hardin & Eisenmann, 1987; Price et al., 1987; Welsch et al., 1987; Ritter et al., 1985) mit der Maus bei oraler Applikation aufgeführt. In Tab. 43 ist der prozentuale Anteil verursachter teratogener Effekte bei verschiedenen Dosen zusammengestellt.

Tab. 43: Zusammenstellung aufgetretener Effekte (%) in Untersuchungen mit der Maus bei oraler Applikation unterschiedlicher Dosen

Diethylenglykoldimethylether		2-Methoxyethanol		Methoxyessigsäure	
mmol/kg		mmol/kg		mmol/kg	
3,73	54 %	2,07	45,2 %	3,4	52 %
4,0	40 %	3,3	47 %		
		4,14	100 %		
		4,6	94 %		

Bei diesen aus unterschiedlichen Studien stammenden Werten wird deutlich, daß ein Anteil von ca. 50 % (47 – 54 %) Effekten in einem Bereich von 3,3 bis 3,73 mmol/kg verursacht wird.

Im *DarT* verursachten Methoxyessigsäure und Methoxyessigsäureisopropylester Effekte in Konzentrationen, die Größenordnungen unter denen von Diethylenglykoldimethylether und 2-Methoxyethanol liegen. Bei Diethylenglykoldimethylether und 2-Methoxyethanol liegen allerdings die Bereiche der teratogenen und letalen Wirkung relativ eng beieinander.

Aus dieser Abstufung der Wirkkonzentrationen und der Tatsache, daß sowohl bei Diethylenglykoldimethylether exponierten als auch bei 2-Methoxyethanol exponierten Embryonen Effekte auftraten, läßt sich schlußfolgern, daß die Embryonen von *Danio rerio* in der Lage sind, diese Substanzen in einem gewissen Umfang metabolisch zu aktivieren. Offensichtlich wird 2-Methoxyethanol in weit geringerem Maß metabolisiert als Diethylenglykoldimethylether. Methoxyessigsäureisopropylester hydrolysiert vermutlich zu Methoxyessigsäure (Jäckh – persönliche Mitteilung, 2002), die das eigentliche Teratogen darstellt und nicht metabolisch aktiviert wird.

3.8.2 Butyldiglykol

Nach einem Vorversuch wurde Butyldiglykol (Diethylenglykolmonobutylether) in den Konzentrationen 3,7; 4,8; 6,2; 8,1 und 10,5 mmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität im Kontrollmedium und in den Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte können der Tab. A 5 (Anhang A) entnommen werden. Der Test ist valide, da die Kontrollen zur Auswertung nach 48 Stunden keine Effekte aufwiesen (siehe Tab. 44 und Tab. 45).

In Tab. 44 ist die Anzahl der koagulierten Embryonen zusammengestellt. Deutlich wird die zeitabhängige Beziehung zwischen Konzentration und letalen Effekten. Diese wurden bereits frühzeitig beobachtet. Nach acht Stunden traten neben den 30 % bzw. 90 % koagulierten Embryonen in den beiden höchsten Konzentrationen gehäuft abgeschnürte Bläschen auf (Tab. 45). Da in diesen Konzentrationen eine osmotische Beeinträchtigung ausgeschlossen werden kann, liegt eine allgemein zytotoxische Wirkung nahe. Die nach 48 Stunden berechnete LC_{50} beträgt 7,9 mmol/L ($R^2 = 0,946$; $b = 11,8$; $LC_{10} = 6,1$ mmol/L).

Tab. 44: Zusammenstellung der letalen Effekte von Butyldiglykol

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	3,7	4,8	6,2	8,1	10,5
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	6	18
	24	–	–	–	3	8	19
	36	–	–	–	3	8	19
	48	–	–	–	3	8	19

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 45 sind die durch Butyldiglykol verursachten subletalen Effekte zusammengestellt. Nach 36 Stunden war das Herz-Kreislaufsystem bei den in 6,2 und 8,1 mmol/L exponierten Embryonen teilweise stark beeinträchtigt. Für den Endpunkt „kein Blutkreislauf“ (36 h) wurde eine EC_{50} von 7,1 mmol/L ($R^2 = 0,982$; $b = 20,9$; $EC_{10} = 6,1$ mmol/L) berechnet. Die signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz ($p = 0,05$) in 8,1 mmol/L (Abb. 27) und das Auftreten zahlreicher Oedeme in den mittleren Konzentrationen geben nach 48 Stunden ebenfalls einen Hinweis auf eine Beeinträchtigung des Kreislaufsystems. Die EC_{50} Oedeme (48 h) entspricht der EC_{50} für die Summe der subletalen Effekte von 7,4 mmol/L ($R^2 = 0,986$; $b = 6,5$; $EC_{10} = 4,7$ mmol/L).

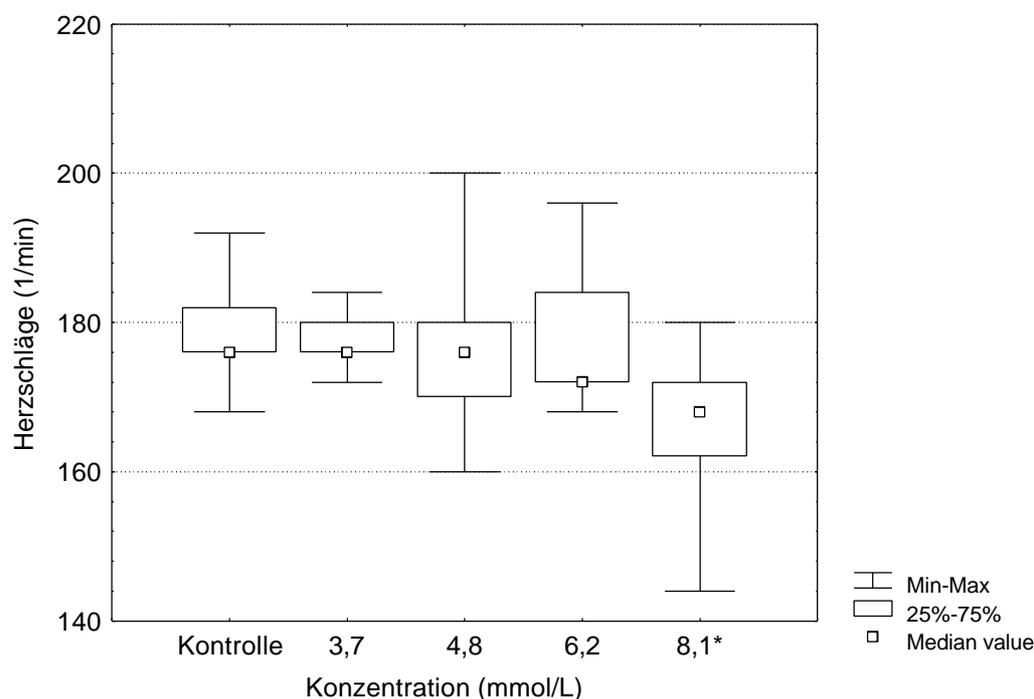


Abb. 27: Wirkung von Butyldiglykol auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$)

NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz: 6,2 / 8,1 mmol/L

Tab. 45: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Butyldiglykol auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	3,7	4,8	6,2	8,1	10,5
Bläschen abgeschnürt	8	–	–	–	1	5/14	2/2
verzögerte Gastrulation	8	–	–	–	1	–	2/2
keine Spontanbewegung	24	–	1	–	1/17	–	1/1
Schwanz nicht abgelöst ^a	24	–	–	–	–	–	1/1
	36	–	–	–	–	–	1/1
	48	–	–	–	–	–	1/1
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	–	1/1
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	–	1/1
	36	–	–	–	–	–	1/1
	48	–	–	–	–	–	–
schwacher Herzschlag	36	–	–	–	–	1/12	–
	48	–	–	–	–	–	–
kein Herzschlag	36	–	–	–	–	–	1/1
	48	–	–	–	–	–	1/1
schwacher Blutkreislauf	36	–	–	–	1/17	–	–
	48	–	–	–	2/17	3/12	–
kein Blutkreislauf	36	1	–	–	4/17	9/12	1/1
	48	–	–	–	–	1/12	1/1
keine Pigmentierung ^a	48	–	–	–	–	–	1/1
Dotteroedem	48	–	–	1	5/17	6/12	–
Perikardoedem	48	–	1	2	2/17	1/12	–
<i>Malformationen:</i>							
Kopfdeformation ^a	24	–	–	–	–	–	1/1
	36	–	–	–	–	–	1/1
	48	–	–	–	–	–	1/1
Spaltembryo ^a	24	–	–	–	–	–	1/1
	36	–	–	–	–	–	1/1
	48	–	–	–	–	–	1/1
Otolithen nicht angelegt ^a	48	–	–	–	–	–	1/1
Σ teratogen		0	0	0	0	0	1/1
Σ subletal		0	1	2	6/17	7/12	1/1

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : Embryo vollkommen deformiert

In der höchsten untersuchten Konzentration (95 % letale Effekte) zeigte der einzige lebende Embryo starke Mißbildungen des gesamten Körpers. Im rudimentär angelegten Kopfbereich waren weder Augen noch Sacculi entwickelt. Es war eine offene Medianspalte zu erkennen (Spaltembryo) und der rudimentäre Schwanz war nicht abgelöst.

Um den Einfluß von Butyldiglykol auf das Längenwachstum zu bewerten, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120

Stunden untersucht. In der höchsten Konzentration (10,5 mmol/L) waren bis zu diesem Zeitpunkt alle Embryonen koaguliert. Die LC_{50} (120 h) entspricht mit 7,9 mmol/L dem Wert der LC_{50} nach 48 Stunden. Weitere Effekte traten nicht auf. Die Schwanzlängen der Larven waren in keiner Konzentration signifikant ($p = 0,05$) reduziert (Abb. 28). In Tab. 46 sind die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC / LOEC zusammengestellt.

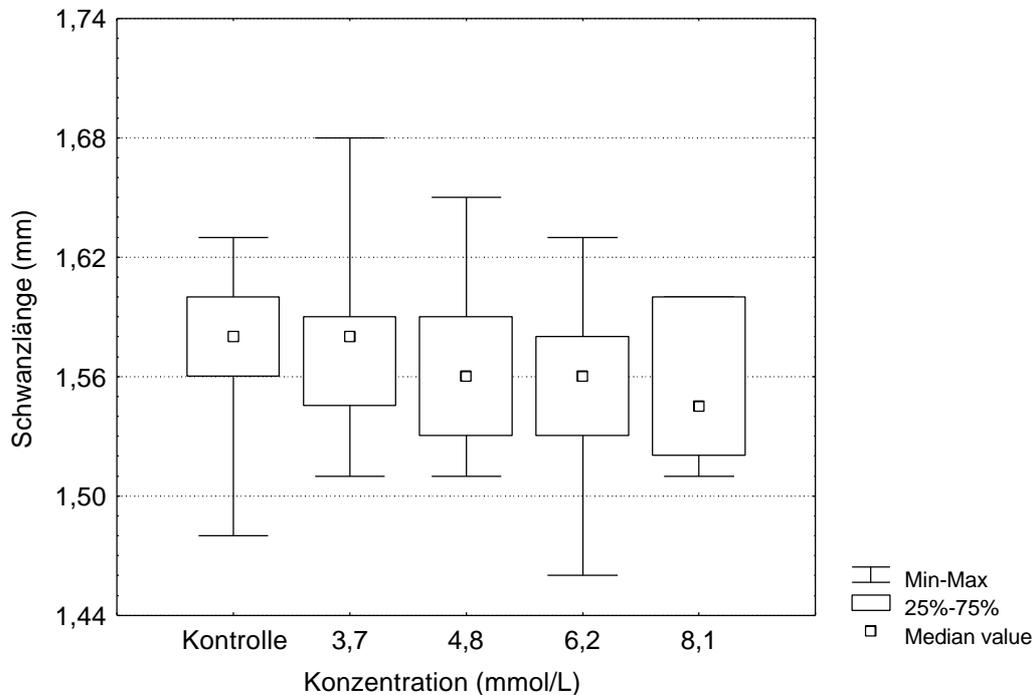


Abb. 28: Wirkung von Butyldiglykol auf die Längenentwicklung des Schwanzes

Tab. 46: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Butyldiglykol

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	7,9 (7,3 – 8,5)
LC_{50}	120	7,9 (7,3 – 8,5)
EC_{50} kein Blutkreislauf	36	7,1 (6,6 – 7,6)
EC_{50} Oedeme	48	7,4 (6,1 – 8,8)
EC_{50} subletal	48	7,4 (6,1 – 8,8)
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	6,2 / 8,1
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	8,1 / –

Der einzige Embryo mit Malformationen fand sich in der höchsten untersuchten Konzentration mit 95 % letaler Wirkung. Die Mißbildungen beruhen auf der stark gestörten Embryonalentwicklung in diesem letalen Konzentrationsbereich und geben kein Hinweis auf ein teratogenes Potential der Substanz bei den Untersuchungen mit *D. rerio*. Diese Bewertung stimmt mit den Befunden aus Untersuchungen an Säugetieren überein, die für Butyldiglykol keine teratogenen Effekte aufzeigen.

Untersuchungen wurden an Mäusen (500 mg/kg/Tag, 6. – 13. Gestationstag), Ratten (oral, 25 – 633 mg/kg/Tag, Gestationstag: 1 – 20) und Kaninchen (oral, 100 – 1.000 mg/kg/Tag, 7.- 18. Gestationstag) durchgeführt. Es ergaben sich keine Hinweis auf embryotoxische oder teratogene Effekte (HSDB, 2001). Untersuchungen von Nolen und Mitarbeiter (1985) bestätigen diese Befunde. Sie verabreichten Ratten bis zum Gestationstag 13 eine orale Tagesdosis von 250 – 1.000 mg/kg. Trächtigen Kaninchen wurden dermal 100 – 1.000 mg/kg (Gestationstag 7 – 18) appliziert. In beiden Fällen wurden weder embryotoxische noch teratogene Effekte verursacht (Nolen et al., 1985).

3.8.3 Diethylenglykol

Aufgrund der Ergebnisse mehrerer Vorversuche wurden zur Bestimmung der LC_{50} die Konzentrationen 362,4; 471,2; 612,5; 796,3 und 1.035,1 mmol/L getestet. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Für die Osmolarität wurden Werte zwischen 1.141 und 3.263 mOsmol/L ermittelt. Die Meßwerte sind in Tab. A 8 (Anhang A) zusammengestellt.

In Tab. 47 ist die Anzahl der koagulierten Embryonen zusammengestellt. Der Test ist valide, da die Kontrollembryonen keine Effekte aufwiesen (siehe Tab. 47). Zu erkennen ist eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Als LC_{50} (48 h) wurde ein Wert von 478,7 mmol/L errechnet ($R^2 = 0,989$; $b = 32,6$; $LC_{10} = 437,3$ mmol/L).

Tab. 47: Zusammenstellung der letalen Effekte von Diethylenglykol

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	362,4	471,2	612,5	796,3	1.035,1
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	4	2	8	–
	24	–	1	5	4	20	20
	36	–	1	5	10	20	20
	48	–	1	5	20	20	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In dem Versuch zur Bestimmung der LC_{50} überwog die letale Wirkung der Substanz. Da bereits in der niedrigsten Konzentration letale Effekte auftraten, wurde in einem weiteren Test der subletale Konzentrationsbereich untersucht (214,4; 278,7; 362,3 und 471,0 mmol/L). Die beiden höchsten Konzentrationen entsprachen hierbei den beiden niedrigsten des ersten Testes, in denen diesmal keine letalen Effekte auftraten. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist das zu berücksichtigen (siehe unten).

Auch in diesem Test wurden bei den Kontrollembryonen keine Effekte festgestellt (siehe Tab. 48), so daß der Versuch valide ist. Die Sauerstoffsättigung und die pH-Werte lagen auch beim zweiten Test im zulässigen Bereich. Die Meßwerte können der Tab. A 8 (Anhang A) entnommen werden. Die ermittelten Werte für die Osmolarität (678 bis 1.486 mOsmol/L) lagen über dem von Lange et al. (1995) angegebenen Grenzwert von 100 mOsmol/L. Trotzdem wurden weder nach 2,5 Stunden noch zu einem späteren Zeitpunkt osmotische

Effekte an den Embryonen beobachtet. In Tab. 48 sind die durch Diethylenglykol verursachten subletalen Effekte zusammengestellt.

Tab. 48: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Diethylenglykol auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)				
		Kontrolle	214,4	278,7	362,3	471,0
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	4	18
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	4	18
	36	–	–	–	4	18
	48	–	–	–	4	18
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	1	7
	36	–	–	–	1	7
	48	–	–	–	1	12
keine Augenanlage	24	–	–	–	1	13
	36	–	–	–	1	13
	48	–	–	–	1	7
schwacher Herzschlag	36	–	–	1/19	–	–
	48	–	–	–	–	1
kein Herzschlag	36	–	–	–	3	19
	48	–	–	–	7	19
schwacher Blutkreislauf	36	–	1	1/19	–	–
	48	–	–	1/19	–	–
kein Blutkreislauf	36	–	3	12/19	20	20
	48	–	2	5/19	20	20
Dotteroedem	48	–	2	5/19	4	–
<i>Malformationen:</i>						
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	2	1
	36	–	–	–	2	1
	48	–	–	–	2	1
Schwanz nicht abgelöst und vollkommen verkrüppelt ^a	24	–	–	–	4	18
	36	–	–	–	4	18
	48	–	–	–	4	18
Schwanzdeformation	24	–	–	–	2	2
	36	–	–	–	1	2
	48	–	–	–	1	2
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	1	2
Σ teratogen		0	0	0	6	20
Σ subletal		0	2	6/19	20	20

In 278,7 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : Embryonen entwickelten keine Somiten, Schwanz nur rudimentär und mißgebildet

Bereits nach 24 Stunden waren in den beiden höchsten Konzentrationen 20 % bzw. 90 % der Embryonen stark geschädigt. Sie hatten keine Somiten angelegt und ließen keine bzw. nur eine diffuse Augenanlage erkennen. Nach 36 und 48 Stunden war der Blutkreislauf der Embryonen in allen Konzentrationen beeinträchtigt. Für die verzögerte Ausbildung von

Herzschlag und Blutkreislauf läßt sich nach 36 Stunden eine EC_{50} von 249,9 mmol/L ermitteln ($b = 13,7$; $EC_{10} = 201,6$ mmol/L). Für eine Wirkung auf das Kreislaufsystem sprechen weiterhin die aufgetretenen Oedeme und eine ab 362,3 mmol/L signifikant ($p = 0,05$) reduzierte Herzschlagfrequenz. Diese ist in Abb. 29 dargestellt. Bereits in 214,4 mmol/L ist die Herzschlagfrequenz gegenüber der Kontrolle reduziert. Bemerkenswert ist, daß die Minimalwerte sich konzentrationsabhängig deutlich verringern.

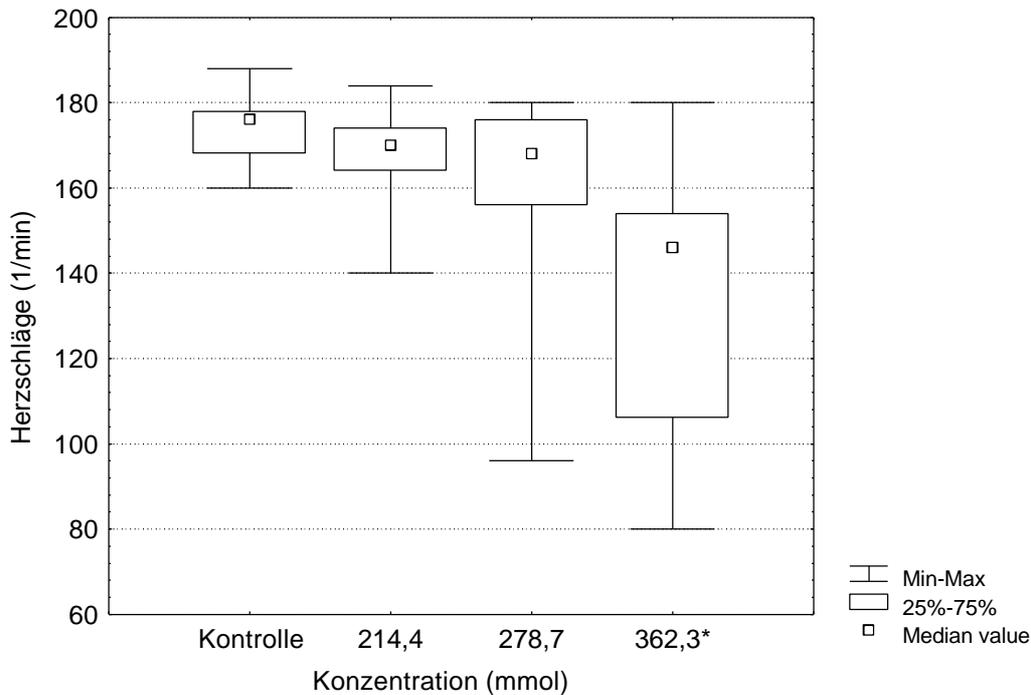


Abb. 29: Wirkung von Diethylenglykol auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC_{reduzierte Herzschlagfrequenz}: 278,7 / 362,3 mmol/L

Nach 48 Stunden entspricht die EC_{50} für die Oedeme und die Beeinträchtigung des Kreislaufsystems der EC_{50} für die Summe der subletalen Effekte mit einem Wert von 281,2 mmol/L ($b = 14,5$; $EC_{10} = 229,3$ mmol/L).

Die fehlende Anlage der Somiten führte zu verschiedenen, teilweise schwere Mißbildungen, wie z.B. eine vollkommene Deformation des Schwanzes und der Chorda im Schwanzbereich. Mißbildungen wurden in der höchsten Konzentration bei allen Embryonen beobachtet. In 362,3 mmol/L waren 30 % der Embryonen davon betroffen. In den beiden anderen Konzentrationen wurden keine teratogenen Effekte beobachtet. Die EC_{50} teratogen (48 h) beträgt 366,8 mmol/L ($R^2 = 0,993$; $b = 32,6$; $EC_{10} = 335,1$ mmol/L). Es gab keinen Hinweis auf eine Wachstumsreduzierung.

In Tab. 49 sind die berechneten EC_{50} , LC_{50} und NOEC / LOEC zusammengestellt. Abb. 30 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die letalen und die teratogenen Effekte.

Tab. 49: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Diethylenglykol

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	478,7 (456,5 – 502,0)
EC ₅₀ Herz-Kreislauf	36	249,9 (230,2 – 269,0)
EC ₅₀ subletal	48	281,2 (261,2 – 302,5)
EC ₅₀ teratogen	48	366,8 (350,9 – 383,4)
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	278,7 / 362,3
TI		1,31

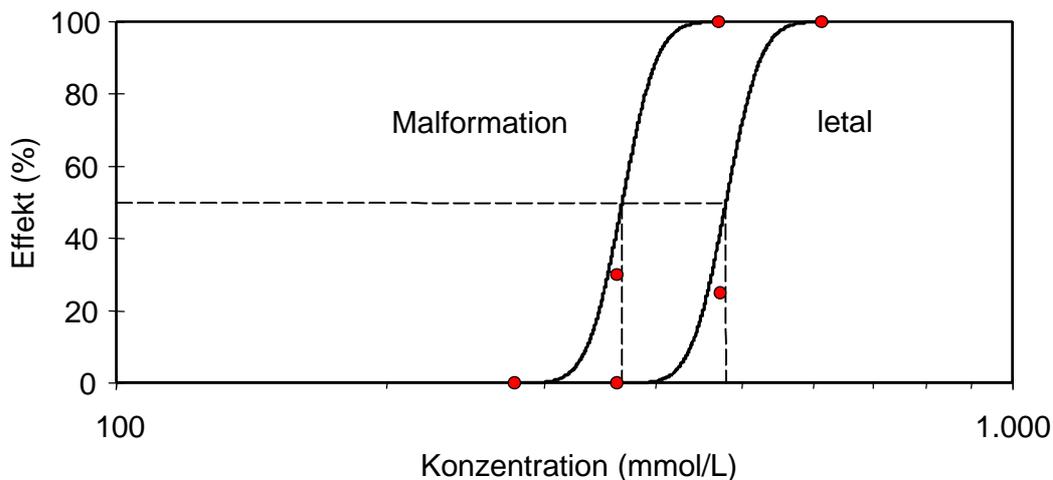


Abb. 30: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Diethylenglykol für die teratogenen und letalen Effekte

LC₅₀ (48 h): 478,7 mmol/L; EC₅₀ teratogen (48 h): 366,8 mmol/L

Die dargestellten Sigmoiden für die Malformationen und die letalen Effekte verlaufen parallel und steigen gleich steil an ($b = 32,6$). Sie sind deutlich voneinander getrennt, liegen aber eng beieinander. Beide Kurven verlaufen steil, was das enge Konzentrationsfenster verdeutlicht, in dem diese Effekte beobachtet wurden.

Teratogene Effekte traten in einem sehr hohen Konzentrationsbereich auf, der durch allgemein toxische Wirkung charakterisiert ist. Im ersten Test zur Ermittlung der LC₅₀ traten in diesen Konzentrationen (362,4 bzw. 471,2 mmol/L) bereits 5 % bzw. 25 % letale Effekte auf. Im zweiten Versuch waren die Embryonen vor allem in 471,0 mmol/L stark geschädigt, jedoch nicht koaguliert. Bei einem Großteil dieser Embryonen wurden keine Somiten angelegt, was zu einer vollkommenen Mißbildung des Schwanzbereiches führte. Aufgrund des beobachteten Effektbildes wird geschlußfolgert, daß Diethylemglykol im *DarT* kein teratogenes Potential erkennen läßt. Durch die deutliche Trennung der ermittelten Werte für EC₅₀ teratogen und LC₅₀ errechnet sich allerdings ein Teratogenitätsindex TI von 1,31. Vor dem Hintergrund der oben genannten Einschränkungen ist dieser Wert aber kritisch zu betrachten.

Aus der Literatur sind beim Säuger keine durch Diethylenglykol verursachten teratogenen Effekte bekannt. Nach Shepard (1992) wurde trächtigen Ratten vom 1. – 20. Gestationstag

täglich Diethylenglykol oral verabreicht (5 % der Nahrung). Außer einer leichten Gewichtsreduktion der neugeborenen Jungtiere wurden keine weiteren Effekte festgestellt.

3.8.4 1-Methoxy-2-propanol

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde 1-Methoxy-2-propanol (Propylenglykolmethylether) in den Konzentrationen 66,6; 93,2; 130,5; 182,7 und 255,8 mmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Da ab 130,5 mmol/L Werte von über 100 mOsmol/L gemessen wurden, können in den drei höchsten Konzentrationen osmotische Effekte nicht ausgeschlossen werden. Alle Werte sind in Tab. A 24 (Anhang A) zusammengestellt.

Der Test ist valide, da bei den Kontrollen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 50 und Tab. 51). In Tab. 50 ist die Anzahl der koagulierten Embryonen aufgeführt. Es bestand eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme letaler Effekte. Die LC_{50} (48 h) beträgt 181,3 mmol/L ($R^2 = 0,998$; $b = 25,5$; $LC_{10} = 161,5$ mmol/L).

Tab. 50: Zusammenstellung der letalen Effekte von 1-Methoxy-2-propanol

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	66,6	93,2	130,5	182,7	255,8
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	4
	24	–	–	–	–	4	19
	48	–	–	–	–	12	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die von 1-Methoxy-2-propanol verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 51 zusammengestellt. In den beiden höchsten Konzentrationen ließ sich eine Störung der frühen Ontogenese erkennen. Nach acht Stunden hatte in 255,8 mmol/L bei acht Embryonen (50 %) die Gastrulation noch nicht begonnen. Bei einem Embryo (5 %) in 182,7 mmol/L war die Gastrulation verzögert - der Dotter war erst zu 1/3 umgewachsen. Zu diesem Zeitpunkt hatten 10 bzw. 50 % der Embryonen in den beiden höchsten Konzentrationen Bläschen abgeschnürt. Dabei handelt es sich vermutlich um osmotische Effekte, wie sie von Lange et al. (1995) beschrieben wurden.

Die Embryonen, die bis zum Meßzeitpunkt nach 24 Stunden die Gastrulation nicht beendet hatten, starben bis zum Versuchsende ab. Die Effekte bei den Endpunkten „Schwanz nicht abgelöst“ und „diffuse bzw. keine Augenanlage“ deuteten nach 24 Stunden auf eine Entwicklungsverzögerung hin. Davon waren 3 Embryonen (15 %) in 130,5 mmol/l und 10 Embryonen (62,5 %) in 182,7 mmol/L betroffen. Ab 93,2 mmol/L zeigten Embryonen Störungen des Blutkreislaufes. Für diese Effekte beträgt die EC_{50} (48 h) 111,7 mmol/L ($R^2 = 0,990$; $b = 16,4$; $EC_{10} = 93,3$ mmol/L). In allen Konzentrationen traten vermehrt Oedeme auf. Berechnet wurde eine EC_{50} Oedeme (48 h) von 92,4 mmol/L ($R^2 = 0,971$; $b = 10,0$; $EC_{10} = 68,8$ mmol/L), die auch der EC_{50} subletal für die Summe der subletalen Effekte entspricht. Zwei sehr stark geschädigte Embryonen in 182,7 mmol/L wiesen keine Pigmentierung auf.

Tab. 51: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 1-Methoxy-2-propanol auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	66,6	93,2	130,5	182,7	255,8
Bläschen abgeschnürt	4	–	–	–	–	–	3
	8	–	–	–	–	2	8/16
	24	–	–	–	–	–	1/1
keine Gastrulation	4	–	–	–	–	–	8
	8	–	–	–	–	1 ^a	8/16
Gastrulation nicht beendet	24	–	–	–	–	3/16	1/1
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	1	9/16	–
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	7/16	–
	48	–	–	–	–	2/8	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	3	6/16	–
	48	–	–	–	–	1/8	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	4/16	–
	48	–	–	–	–	–	†
schwacher Blutkreislauf	48	–	–	1	1	–	†
kein Blutkreislauf	48	–	–	2	14	8/8	†
keine Pigmentierung	48	–	–	–	–	2/8	†
Dotteroedem	48	–	2	6	15	8/8	†
Perikardoedem	48	–	–	6	14	4/8	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	2	3/8	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	2	4/16	–
	48	–	–	–	2	5/8	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	1	–	–
	48	–	–	–	2	1/8	†
Spaltembryo	24	–	–	–	–	7/16	–
	48	–	–	–	–	2/8	†
Σ teratogen	24	0	0	0	2	10/16	0
Σ teratogen	48	0	0	0	4	6/8	†
Σ subletal		0	2	8	19	8/8	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : Gastrulation im Vergleich zu Kontrollen verzögert

Teratogene Effekte wurden in 130,5 und 182,7 mmol/L verursacht. Nach 48 Stunden wiesen 20 % bzw. 75 % der Embryonen Deformationen der Chorda, des Schwanzes bzw. der Schwanzspitze auf. Beachtet werden muß, daß nach 24 Stunden bei sieben Embryonen (43,8 %) in 182,7 mmol/L die Symptome eines Spaltembryos (offener Medianspalt, „Schwanzstummel“ nicht abgelöst) beobachtet wurden. Fünf dieser Embryonen starben innerhalb der folgenden 24 Stunden ab. Die teratogenen Effekte wurden zumindest teilweise von letalen Effekten überlagert. Die EC_{50} teratogen (24 h) liegt mit 169,3 mmol/L ($R^2 = 0,986$;

b = 13,8; EC₁₀ = 136,7 mmol/L) etwa 6 % höher als die EC_{50 teratogen} nach 48 Stunden, für die ein Wert von 159,1 mmol/L berechnet wurde (R² = 0,969; b = 15,0; EC₁₀ = 130,8 mmol/L).

Um den Einfluß von 1-Methoxy-2-propanol auf das Längenwachstum zu ermitteln, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Die dabei festgestellten Effekte sind in Tab. 52 zusammengestellt.

Tab. 52: Zusammenstellung der Effekte von 1-Methoxy-2-propanol auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 Stunden

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	66,6	93,2	130,5	182,7	255,8
koaguliert ^a	120	–	–	1	2	18	20
kein Blutkreislauf	120	–	–	–	6/18	1/2	†
Dotteroedem	120	–	1	–	7/18	1/2	†
Perikardoedem	120	–	–	–	7/18	2/2	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	120	–	–	–	3/18	–	†
Schwanzdeformation	120	–	–	–	3/18	–	†
deformierte Schwanzspitze	120	–	–	–	2/18	–	†
Säbelschwanz	120	–	–	–	–	1/2	†
Σ teratogen	120	0	0	0	6/18	1/2	†
Σ subletal	120	0	1	0	10/18	2/2	†

Anzahl der Larven je „Konzentration“ n = 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : koagulierte und nicht geschlüpfte Embryonen zusammengefaßt

Nach 120 Stunden waren weitere Embryonen abgestorben. Die LC₅₀ (120 h) beträgt 154,4 mmol/L (R² = 0,999; b = 17,0; LC₁₀ = 129,8 mmol/L) und liegt damit 15 % unter der LC₅₀ (48 h). Nach Beendigung der Exposition ergab sich für 1-Methoxy-2-propanol ein Hinweis auf verzögert einsetzende letale Effekte. In die Berechnung dieser LC₅₀ gingen die nicht geschlüpfen Embryonen mit ein, da sie sich bereits in Lyse befanden.

Fehlender Blutkreislauf und Oedeme an Dotter bzw. Perikard wurden als subletale Effekte an den Larven festgestellt. Sechs Larven (33,3 %) in 130,5 mmol/L wiesen eine Deformation der Chorda und des Schwanzes bzw. der Schwanzspitze auf. Der spezielle Effekt „Säbelschwanz“ wurde bei einer der beiden lebenden Larven in 182,7 mmol/L beobachtet. Die gesamte Körperachse einschließlich des Schwanzes war nach dorsal gebogen. Für diese teratogenen Effekte nach 120 Stunden wurde eine EC_{50 teratogen} von 151,1 mmol/L berechnet (b = 9,7; EC₁₀ = 111,6 mmol/L). Werden die Schwanzlängen der Larven mit in die Betrachtungen einbezogen, ergibt sich das in Abb. 31 dargestellte Bild.

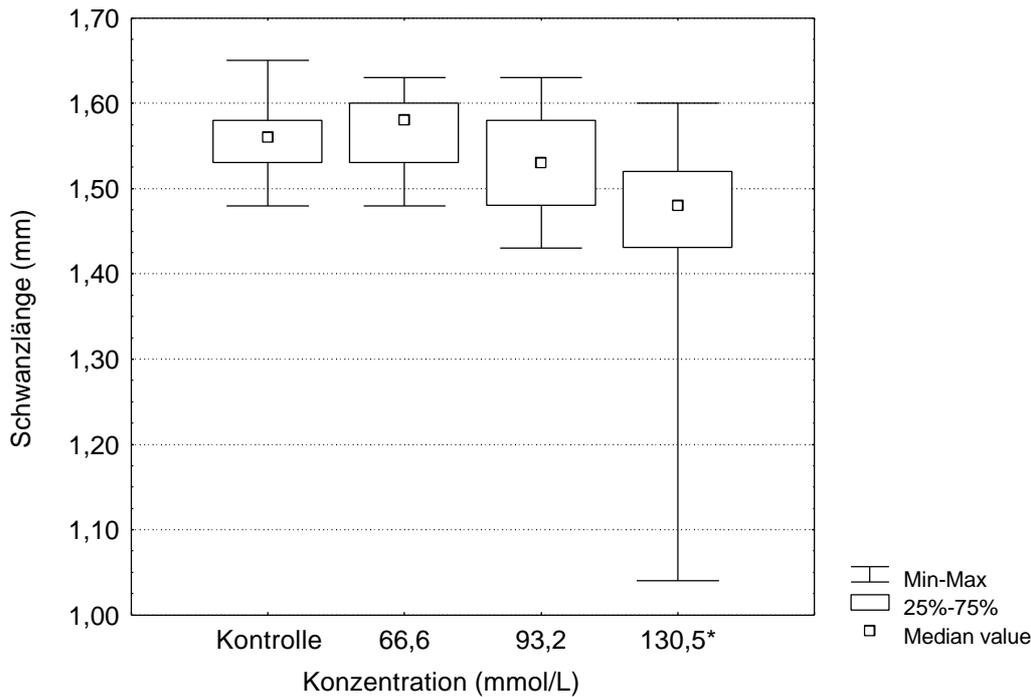


Abb. 31: Wirkung von 1-Methoxy-2-propanol auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge: 93,2 / 130,5 mmol/L

In 130,5 mmol/L ist die Schwanzlänge gegenüber der Kontrolle signifikant reduziert ($p = 0,05$), allerdings streuten die Minimal- und Maximalwerte im Vergleich zu den anderen Konzentrationen und der Kontrolle sehr weit.

Die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC / LOEC sind in Tab. 53 zusammengestellt. Abb. 32 veranschaulicht die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die teratogenen und die letalen Effekte.

Tab. 53: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 1-Methoxy-2-propanol

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	181,3 (172,2 – 190,9)
LC_{50}	120	154,4 (144,1 – 165,4)
EC_{50} Blutkreislauf	48	111,7 (104,0 – 119,9)
EC_{50} Oedeme	48	92,4 (84,3 – 101,3)
EC_{50} subletal	48	92,4 (84,3 – 101,3)
EC_{50} teratogen	24	169,3 (154,8 – 185,1)
EC_{50} teratogen	48	159,1 (143,6 – 176,4)
EC_{50} teratogen	120	151,1 (132,4 – 269,9)
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	93,2 / 130,5
TI		1,14

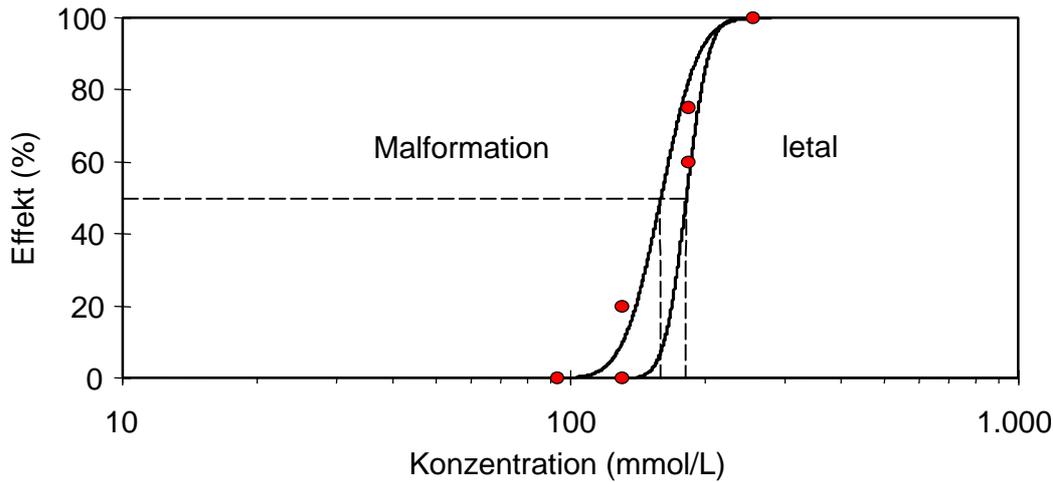


Abb. 32: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von 1-Methoxy-2-propanol für die teratogenen und letalen Effekte

LC₅₀ (48 h): 181,3 mmol/L; EC₅₀ teratogen (48 h): 159,1 mmol/L

Die Kurven verlaufen nicht parallel zueinander. Die Sigmoiden für die teratogenen Effekte steigt etwas flacher an ($b = 15,0$) als die der letalen Effekte ($b = 25,5$). Dadurch laufen beide Kurven im obersten Bereich zusammen, im mittleren Bereich sind sie jedoch deutlich voneinander getrennt. Teratogene Effekte wurden zu 20 % in einer Konzentration (130,5 mmol/L) verursacht, in der noch keine letalen Effekte auftraten. In dieser Konzentration wurde auch eine signifikante ($p = 0,05$) Reduzierung des Längenwachstums festgestellt. In der nächst höheren Konzentration waren bereits 60 % der Embryonen abgestorben. Von den überlebenden Embryonen wiesen 75 % zum Teil massive Malformationen auf. Der Teratogenitätsindex TI von 1,14 verdeutlicht, in welchem engen Konzentrationsfenster letale und teratogene Effekte auftraten.

1-Methoxy-2-propanol verursacht im Tierversuch beim Säuger keine teratogenen Effekte. Weder bei Ratte, noch bei Maus oder Kaninchen wurden fetotoxische oder teratogene Effekte beobachtet, wenn 200 – 600 ppm (ihl.), bis zu 1.850 mg/kg/Tag (oral) und bis zu 740 mg/kg/Tag (scu.) appliziert wurden (BUA 173, 1996). Hanley et al. (1984) exponierten Ratten (6. – 15. Gestationstag) und Kaninchen (6. – 18. Gestationstag) via Inhalation sechs Stunden täglich gegenüber 500, 1.500 und 3.000 ppm 1-Methoxy-2-propanol. Es wurden weder embryotoxische noch teratogene Effekte festgestellt.

In den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* traten teratogene Effekte und Wachstumsreduzierung auf. Da letale Effekte und Malformationen in einem engen Konzentrationsbereich auftraten und die meisten teratogenen Effekte in einer Konzentration verursacht wurden, in der die letalen Effekte überwogen, kann davon ausgegangen werden, daß 1-Methoxy-2-propanol im *DarT* ein geringes teratogenes Potential zeigt.

Die eindeutig nicht teratogenen Befunde aus Untersuchungen mit Säugetieren werden im *DarT* nicht wiedergegeben.

3.9 2,5-Hexandion

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurden folgende Konzentrationen untersucht: 10,5; 15,8; 23,7; 35,5 und 53,2 mmol/L. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 15 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da in den Kontrollen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 54 und Tab. 55).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 54 aufgeführt. Die aus diesen Werten mittels "Spearman-Kärber" Methode berechnete LC₅₀ nach 48 Stunden beträgt 40,9 mmol/L.

Tab. 54: Zusammenstellung der letalen Effekte von 2,5-Hexandion

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	10,5	15,8	23,7	35,5	53,2
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	3	19
	48	–	–	–	–	3	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die durch 2,5-Hexandion verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 55 aufgeführt. Nach 2,5 Stunden wurden bei drei Embryonen der höchsten Konzentration Bläschen an den Blastomeren festgestellt. 24 Stunden nach Expositionsbeginn waren in dieser Konzentration 95 % der Embryonen abgestorben. Der Überlebende hatte bis zu diesem Zeitpunkt die Gastrulation nicht beendet und koagulierte innerhalb der folgenden 24 Stunden. In 35,5 mmol/L ließen nach 24 Stunden 15 Embryonen (88,2 %) keine Spontanbewegung erkennen. Mittels der Parameter „Schwanz nicht abgelöst“ und „diffuse bzw. keine Augenanlage“ läßt sich in 35,5 mmol/L bei 13 Embryonen (76,5 %) eine Entwicklungsverzögerung erkennen, wobei verschiedene Embryonen mehrere Effekte aufwiesen. In 23,7 mmol/L betraf das einen Embryo (5 %). Eine Beeinträchtigung des Blutkreislaufes wurde nach 48 Stunden in 35,5 mmol/L bei allen Embryonen und in 23,7 mmol/L bei 55 % der Embryonen festgestellt. Die dafür berechnete EC₅₀ (48 h) beträgt 23,5 mmol/L ($R^2 = 0,9996$; $b = 21,1$; $EC_{10} = 20,5$ mmol/L). Oedeme traten zu diesem Zeitpunkt in allen Konzentrationen vermehrt auf, wobei in den beiden niedrigsten Konzentrationen nur Dotterödeme beobachtet wurden (jeweils 10 %). Die EC_{50 Oedeme} (48 h) beträgt 34,7 mmol/L ($R^2 = 0,817$; $b = 2,7$; $EC_{10} = 11,7$ mmol/L). Diese Angabe muß kritisch betrachtet werden, da Oedeme maximal zu 47,1 % auftraten (in 35,5 mmol/L). Die Bestimmung der EC₅₀ durch Extrapolation ist nicht zulässig, wenn weniger als 50 % Effekte auftraten. Eine Probitanalyse wurde dennoch durchgeführt, da im Anpassungstest χ^2 gehalten wurde und trotz der jeweils 10 % Effekte in den beiden niedrigsten Konzentrationen, eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung über den Bereich aller vier Konzentrationen zu erkennen war. Wie der Tab. 56 entnommen werden kann, hat die EC_{50 Oedeme} allerdings einen weiten Vertrauensbereich.

In 35,5 mmol/L wiesen alle lebenden Embryonen eine bedeutend geringere Pigmentierung als die Kontrollen auf. Für alle subletalen Effekte nach 48 Stunden wurde mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode eine EC₅₀ von 21,0 mmol/L berechnet.

Tab. 55: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 2,5-Hexandion auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	10,5	15,8	23,7	35,5	53,2
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	–	–	3
Gastrulation nicht beendet	24	–	–	–	–	–	1/1
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	–	15/17	–
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	1	7/17	–
	48	–	–	–	–	1/17	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	8/17	–
	48	–	–	–	–	–	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	3/17	–
	48	–	–	–	–	–	†
schwacher Blutkreislauf	48	–	–	–	1	–	†
kein Blutkreislauf	48	–	–	–	10	17/17	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	–	17/17	†
Dotterödem	48	–	2	2	7	7/17	†
Perikardoedem	48	–	–	–	2	1/17	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	1	1/17	–
	48	–	–	–	2	7/17	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	5/17	–
	48	–	–	–	–	5/17	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	1	–	–
	48	–	–	–	1	6/17	†
Spaltembryo	24	–	–	–	–	2/17	–
	48	–	–	–	–	2/17	†
Σ teratogen		0	0	0	2	14/17	†
Σ subletal		0	2	2	14	17/17	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Nach 48 Stunden traten teratogene Effekte bei zwei Embryonen (10 %) in 23,7 mmol/L und bei 14 Embryonen (82,4 %) in 35,5 mmol/L auf. Vor allem wurden Deformationen der Schwanzspitze und der Chorda im Schwanzbereich beobachtet. Fünf der in 35,5 mmol/L exponierten Embryonen (29,4 %) wiesen eine starke Mißbildung des gesamten Schwanzes auf. Zwei dieser Embryonen (11,8 %) ließen zudem eine offene Medianspalte erkennen. Sie zeigten die für „Spaltembryonen“ typischen Symptome. Für die $EC_{50 \text{ teratogen}}$ (48 h) wurde ein Wert von 30,0 mmol/L berechnet ($R^2 = 0,999$; $b = 13,2$; $EC_{10} = 24,0$ mmol/L). Es gab keinen Hinweis auf Reduktion des Längenwachstums.

In Tab. 56 sind die berechneten LC_{50} und EC_{50} zusammengestellt. Abb. 33 zeigt den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die teratogenen Effekte. In die Darstellung wurden auch die letalen Effekte eingefügt.

Tab. 56: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 2,5-Hexandion

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	40,9 (38,3 – 43,6)
EC ₅₀ Blutkreislauf	48	23,5 (22,2 – 25,0)
EC ₅₀ Oedeme	48	34,7 (22,9 – 52,6)
EC ₅₀ subletal	48	21,0 (18,9 – 23,3)
EC ₅₀ teratogen	48	30,0 (27,3 – 32,9)
TI		1,36

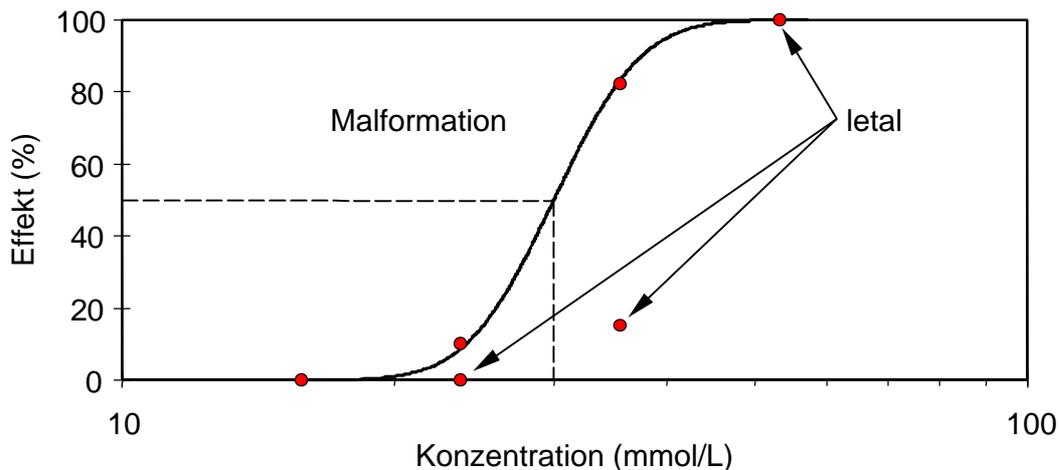


Abb. 33: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von 2,5-Hexandion für die teratogenen Effekte und Lage der letalen Effekte

LC₅₀ (48 h): 40,9 mmol/L; EC₅₀ teratogen (48 h): 30,0 mmol/L

Teratogene und letale Effekte traten in einem relativ engen Konzentrationsfenster auf. Es ist zu beachten, daß die Abszisse in der Abb. 33 nur eine Zehnerpotenz umfaßt. Nennenswerte teratogene Effekte (u. a. Spaltembryonen) fanden sich erst in einer Konzentration, in der bereits 15 % der Embryonen abgestorben waren. Dennoch überschneidet sich die Sigmoide für die Malformationen nicht mit dem angenommenen Konzentrations-Wirkungs-Verlauf der letalen Effekte. Für den Teratogenitätsindex TI wurde ein Wert von 1,36 ermittelt.

Beim Säuger sind keine durch 2,5-Hexandion verursachten teratogenen Effekte bekannt. Lewis (2000) stuft 2,5-Hexandion als nicht säugerneratogen ein. Bei der Ratte wird n-Hexan unter anderem zu 2,5-Hexandion metabolisiert (Shepard, 1992). Trächtige Ratten wurden vom Gestationstag acht bis 16 via Inhalation (6 h/Tag) gegenüber 1.000 ppm n-Hexan exponiert. Weder die Anzahl der resorbierten noch der toten oder mißgebildeten Feten war erhöht. Die Konzentrationen von n-Hexan und 2,5-Hexandion in den Feten stimmten mit den Konzentrationen im maternalen Blut überein (Bus et al., 1979).

Bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* verursacht 2,5-Hexandion teratogene Effekte hauptsächlich in einem Konzentrationsbereich, der durch letale bzw. allgemein toxische Effekte charakterisiert ist. Andererseits deutet das Auftreten massiver Mißbildungen (z.B. Spaltembryo) auf ein gewisses teratogenes Potential dieser Substanz hin. Die aus

Untersuchungen mit Säugetieren bekannte Einordnung „nicht teratogen“ wurde im *DarT* nicht deutlich wiedergegeben und stellt somit ein falsch positives Ergebnis dar. Aufgrund der genannten Befunde wird das teratogene Potential als gering eingeschätzt.

3.10 Hydroxyharnstoff

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurden folgende Konzentrationen untersucht: 9,2; 13,8; 20,7; 31,1 und 46,6 mmol/L. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind der Tab. A 16 (Anhang A) zu entnehmen. Der Test erfüllt die Validitätskriterien, da die Kontrollembryonen keine Effekte aufwiesen (siehe Tab. 57 und Tab. 58).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 57 zusammengestellt. Zu erkennen ist die konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Eine deutliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ergab sich erst nach 48 Stunden. Die LC_{50} (48 h) beträgt 30,4 mmol/L ($R^2 = 0,985$; $b = 8,3$; $LC_{10} = 21,3$ mmol/L).

Tab. 57: Zusammenstellung der letalen Effekte von Hydroxyharnstoff

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	9,2	13,8	20,7	31,1	46,6
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	–	13
	48	–	–	–	2	9	19

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 58 sind die durch Hydroxyharnstoff verursachten subletalen Effekte zusammengestellt. Nach 24 Stunden hatten ein Embryo (5 %) in 20,7 mmol/L, in 31,1 mmol/L zwei Embryonen (10 %) und in 46,6 mmol/L fünf der noch lebenden Embryonen (71,4 %) die Gastrulation nicht beendet. Die Störung dieser frühen Entwicklungsstadien wurde vermutlich durch die Hemmung der DNA-Synthese verursacht (Scott et al., 1971). Das vermehrte Absterben von Zellen führte dazu, daß innerhalb der folgenden 24 Stunden diese Embryonen koagulierten.

Eine Verzögerung bei der Entwicklung der Augen und bei der Ablösung des Schwanzes vom Dotter ließ sich nach 24 Stunden erkennen. Auch diese Effekte waren zeit- und konzentrationsabhängig. In den drei geringsten Konzentrationen hatten sich die Embryonen bis nach 48 Stunden normal entwickelt, während in 31,1 mmol/L 63,6 % der Embryonen davon betroffen waren. Die EC_{50} Entwicklungsverzögerung (24 h) beträgt 21,6 mmol/L ($R^2 = 0,980$; $b = 7,1$; $EC_{10} = 14,3$ mmol/L).

Als weitere Wirkung der Substanz wurde nach 48 Stunden eine Beeinträchtigung des Kreislaufsystems ersichtlich. In 13,8 mmol/L waren davon 30 % der Embryonen betroffen, in 20,7 mmol/L 88,9 % und ab 31,1 mmol/L alle nicht koagulierten Embryonen. Für die Beeinträchtigung des Kreislaufsystems läßt sich nach 48 Stunden eine EC_{50} von 16,4 mmol/L angeben ($R^2 = 0,988$; $b = 13,7$; $EC_{10} = 13,2$ mmol/L). Weiterhin traten konzentrations-

abhängig Oedeme des Perikards und am Dotter auf. Die EC_{50} Oedeme (48 h) beträgt 13,9 mmol/L ($R^2 = 0,970$; $b = 6,4$; $EC_{10} = 8,8$ mmol/L).

In der höchsten Konzentration war der einzige lebende Embryo sehr stark geschädigt und hatte neben verschiedenen Malformationen (siehe unten) keinen Herzschlag und ein stark ausgeprägtes Perikardoedem. Die EC_{50} für die gesamten subletalen Effekte nach 48 Stunden beträgt 13,7 mmol/L ($R^2 = 0,988$; $b = 6,4$; $EC_{10} = 8,7$ mmol/L).

Tab. 58: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Hydroxyharnstoff auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	9,2	13,8	20,7	31,1	46,6
Gastrulation nicht beendet	24	–	–	–	1	2	5/7
keine Spontanbewegung	24	–	–	1	11	17	2/7
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	2	7	1/7
	48	–	–	–	–	2/11	–
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	3	11	2/7
	48	–	–	–	–	3/11	1/1
diffuse Augenanlage	24	–	–	1	3	7	–
	48	–	–	–	–	4/11	–
keine Augenanlage	24	–	–	1	4	9	2/7
	48	–	–	–	–	3/11	1/1
kein Herzschlag	48	–	–	2	11/18	8/11	1/1
schwacher Blutkreislauf	48	–	–	1	–	–	–
kein Blutkreislauf	48	–	–	5	16/18	11/11	1/1
Dotteroedem	48	–	1	5	15/18	6/11	–
Perikardoedem	48	–	3	6	14/18	10/11	1/1
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	6	2	–
	48	–	1	4	16/18	7/11	1/1
Augendeformation	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	1	3/18	–	–
Kopfdeformation	24	–	–	–	1	3	1/7
	48	–	–	1	3/18	4/11	–
Schwanzdeformation	24	–	–	1	2	3	–
	48	–	–	2	7/18	9/11	1/1
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	5	1	–
	48	–	–	2	11/18	9/11	1/1
Herzdeformation	48	–	2	5	3/18	3/11	–
Otolithen nicht angelegt	48	–	–	–	4/18	6/11	1/1
Σ teratogen		0	3	8	16/18	11/11	1/1
Σ subletal		0	3	9	16/18	11/11	1/1

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Grobstrukturelle Malformationen wurden in allen Konzentrationen festgestellt. Es handelte sich um Deformationen der Chorda und des Schwanzes und um Malformationen an Augen und Kopf (Abb. 34). In den beiden höchsten Konzentrationen dürften die schweren Schwanzdeformationen darauf zurückzuführen sein, daß teilweise der Schwanz nicht vom Dotter abgelöst wurde. Bemerkenswert sind die Deformationen des Herzens. 10 bis 27,3 % der Embryonen hatten ein schlauchförmiges Herz ausgebildet. Dieser Effekt fand sich immer im Zusammenhang mit Oedemen des Perikards. In den drei höchsten Konzentrationen, in denen bereits Embryonen koaguliert waren, legten mehr als 22 % der Embryonen in den Sacculi keine Otolithen an. Für die teratogenen Effekte nach 48 Stunden beträgt die $EC_{50 \text{ teratogen}}$ 13,9 mmol/L ($R^2 = 0,970$; $b = 6,4$; $EC_{10} = 8,8$ mmol/L).

Zur Beurteilung der Substanzwirkung auf das Längenwachstum wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Die dabei beobachteten Effekte sind in Tab. 59 zusammengestellt.

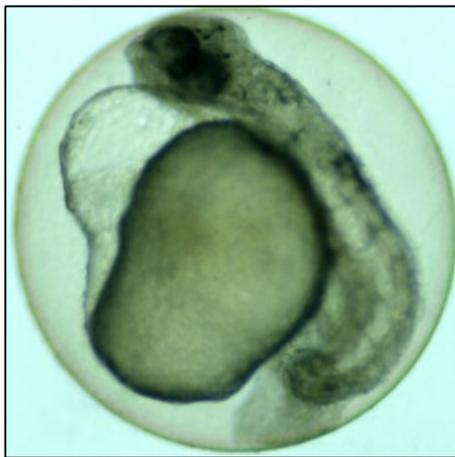


Abb. 34: Embryo nach 48stündiger Exposition in 20,7 mmol/L Hydroxyharnstoff

Kopf- und Augendeformation, Schwanzdeformation, Otolithen nicht angelegt, Perikardoedem (60fache Vergrößerung)

Tab. 59: Zusammenstellung der Effekte von Hydroxyharnstoff auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 Stunden

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	9,2	13,8	20,7	31,1	46,6
koaguliert ^a	120	–	–	3	18	20	20
Dotteroedem	120	–	1	3/17	–	†	†
Perikardoedem	120	–	1	3/17	–	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	120	–	1	2/17	–	†	†
deformierte Schwanzspitze	120	–	–	1/17	–	†	†
Säbelschwanz	120	–	–	1/17	–	†	†
Σ teratogen		0	1	3/17	0	†	†
Σ subletal		0	2	6/17	0	†	†

Anzahl der Larven je „Konzentration“ n = 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : koagulierte und nicht geschlüpfte Embryonen zusammengefaßt

Für die LC₅₀ nach 120 Stunden wurde ein Wert von 16,7 mmol/L berechnet ($R^2 = 0,999$; $b = 14,0$; $LC_{10} = 13,6$ mmol/L). Die nicht geschlüpfen Embryonen gingen mit in diese Berechnung ein, da sie sich bereits in Lyse befanden.

Vor allem in der Konzentration 13,8 mmol/L traten neben Oedemen Deformationen des Schwanzes und der Chorda an den Larven (17,6 %) auf. Werden die Schwanzlängen der Larven mit in die Betrachtung einbezogen, ergibt sich das in Abb. 35 dargestellte Bild.

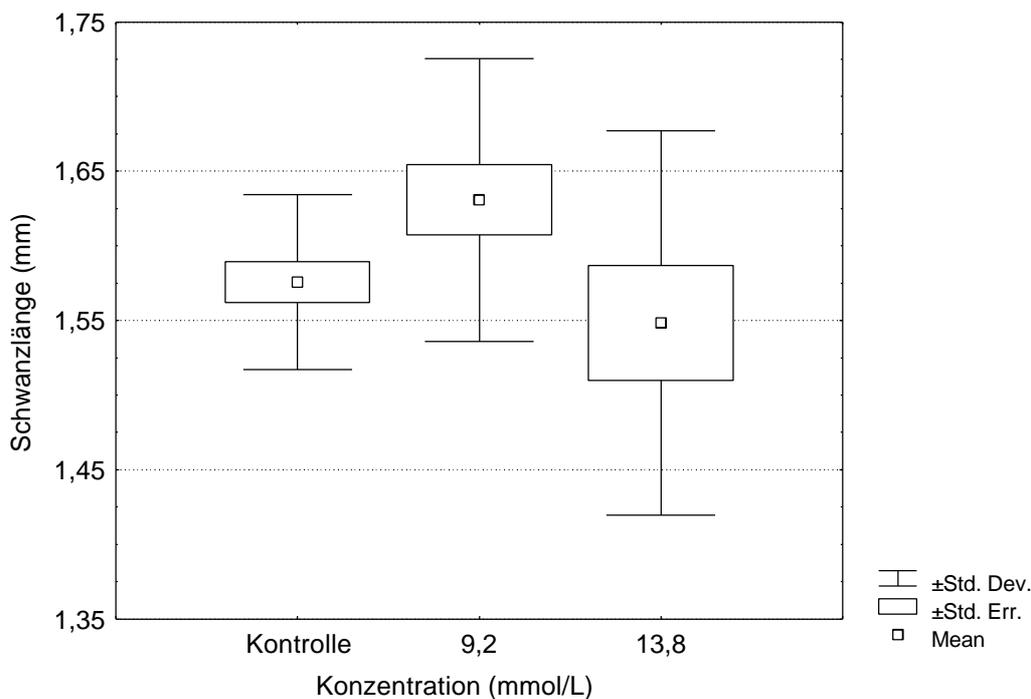


Abb. 35: Wirkung von Hydroxyharnstoff auf die Längenentwicklung des Schwanzes

In der mittleren Konzentration von 20,7 mmol/L waren nur zwei Larven geschlüpft, so daß neben der Kontrolle nur die zwei niedrigsten Konzentrationen in die Auswertung der Schwanzlänge eingehen konnten. Der Mittelwert in 9,2 mmol/L liegt über dem der Kontrollen. Tendenziell ist der Wert in 13,8 mmol/L kleiner als der der Kontrollen, aber nicht signifikant reduziert ($p = 0,05$).

Tab. 60 faßt die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC zusammen, in Abb. 36 sind die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für teratogene und letale Effekte graphisch dargestellt.

Tab. 60: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Hydroxyharnstoff

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	30,4 (27,2 – 34,0)
LC_{50}	120	16,7 (15,4 – 18,2)
EC_{50} Entwicklungsverzögerung	24	21,6 (19,1 – 24,5)
EC_{50} Blutkreislauf	48	16,4 (15,0 – 17,9)
EC_{50} Oedeme	48	13,9 (12,2 – 15,9)
EC_{50} subletal	48	13,7 (12,0 – 15,7)
EC_{50} teratogen	48	13,9 (12,2 – 15,9)
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	13,8 / –
TI		2,19

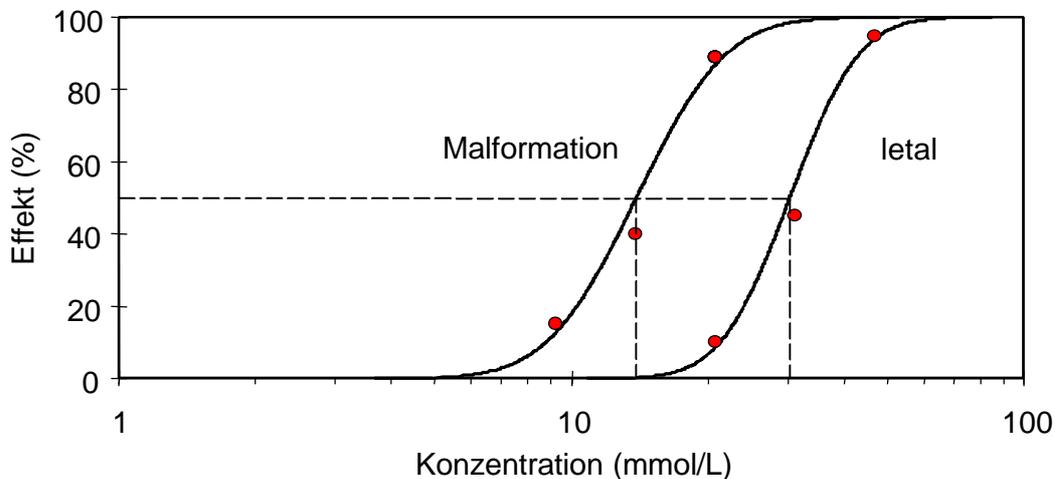


Abb. 36: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Hydroxyharnstoff für die teratogenen und letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 30,4 mmol/L; EC_{50} teratogen (48 h): 13,9 mmol/L

Die Sigmoiden für die teratogenen und letalen Effekte sind deutlich voneinander getrennt und verlaufen nahezu parallel. Die Kurve für die letalen Effekte steigt etwas steiler an ($b = 8,3$) als die für die Malformationen ($b = 6,4$). Der Teratogenitätsindex TI von 2,19 unterstreicht die deutliche Trennung von LC_{50} und EC_{50} teratogen und verdeutlicht das teratogene Potential von Hydroxyharnstoff.

Nach Lewis (2000) verursacht Hydroxyharnstoff in Untersuchungen mit Säugetieren teratogene Effekte. Bei Ratten wurden nach ipr. Injektion von 500 mg/kg (11. Gestationstag) Malformationen der Gliedmaßen und des Schwanzes sowie Gaumenspalten verursacht. 98,8 % der am 21. Gestationstag lebenden Feten wiesen diese Effekte auf (Chaubé & Murphy, 1973). Scott et al. (1971) wiesen nach, daß Hydroxyharnstoff die DNA-Synthese in Rattenembryonen hemmt. Der damit verbundene Zelltod in den Anlagen der Gliedmaßen führte zu starken Malformationen. Beim Hamster verursachten 50 mg/kg (iv., 9. – 11. Gestationstag) bei 44 – 75 % der Embryonen Deformationen des Herzens und des Neuralrohres (Ferm, 1966). Wilson et al. (1975) wiesen durch Hydroxyharnstoff verursachte teratogene Effekte in der Ratte und in Rhesusaffen nach.

Aus Untersuchungen in vivo und in vitro mit der Maus (ipr.: 3,9 mmol/kg bzw. “Whole Embryo Culture“: 3,9 mmol/L) sind Deformationen des Gesichtsschädels und anormale Entwicklung der Gliedmaßenanlagen bekannt (Warner et al., 1983). Bei diesen in vitro-Untersuchungen traten die Effekte in einer Konzentration auf, die etwa 30 % der im *DarT* für die Malformationen ermittelten $EC_{50\text{ teratogen}}$ beträgt.

3.11 Isoniazid

Zur Erfassung letaler Effekte wurde Isoniazid in den Konzentrationen 160,4; 208,5; 271,3; 352,3 und 457,9 mmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Da in allen fünf Konzentrationen Werte über 100 mOsmol/L ermittelt wurden, können osmotische Effekte an den Embryonen nicht ausgeschlossen werden (Lange et al., 1995). Die Meßwerte sind in Tab. A 18 (Anhang A) zusammengestellt.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 61 aufgeführt. Der Test ist valide, da die Kontrollembryonen keine Effekte aufwiesen. Letale Effekte traten erst relativ spät im Versuchsverlauf auf. In der höchsten Konzentration waren nach 36 Stunden sieben Embryonen koaguliert (35 %). Nach 48 Stunden waren in dieser Konzentration alle, in 352,3 mmol/L 18 Embryonen (90 %) und in 271,3 mmol/L zwei Embryonen (10 %) abgestorben. Die LC_{50} (48 h) beträgt 309,1 mmol/L ($R^2 = 0,999$; $b = 21,9$; $LC_{10} = 270,0$ mmol/L).

Tab. 61: Zusammenstellung der letalen Effekte von Isoniazid

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	160,4	208,5	271,3	352,3	457,9
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	7
	48	–	–	–	2	18	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In einem weiteren Test wurde der subletale Konzentrationsbereich mit 72,9; 94,8; 123,2; 160,4 und 208,5 mmol/L untersucht. Auch bei diesem Test lagen alle Werte für die Sauerstoffsättigung und pH-Werte im zulässigen Bereich. Die Osmolarität war in den drei

höchsten Konzentrationen größer als 100 mOsmol/L (siehe Tab. A 18, Anhang A). Die von Isoniazid verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 62 zusammengestellt. Der Test erfüllt die Validitätskriterien, da in den Kontrollen nur 5 % Effekte auftraten.

Obwohl die Osmolarität in den drei höchsten Konzentrationen über 100 mOsmol/L lag, wurden keine der von Lange et al. (1995) beschriebenen osmotischen Effekte in der frühen Embryonalentwicklung beobachtet. Erste Effekte traten nach 24 Stunden auf. In allen Konzentrationen fanden sich Embryonen, die keine Spontanbewegung aufwiesen. Bei der Ablösung des Schwanzes vom Dotter und der Entwicklung der Augen läßt sich nach 24 Stunden eine Entwicklungsverzögerung erkennen. Für diese Effekte wurde eine EC_{50} (24 h) von 134,2 mmol/L ermittelt ($b = 8,7$; $EC_{10} = 95,6$ mmol/L). Effekte am Herz-Kreislaufsystem (schwacher bzw. kein Blutkreislauf) traten nach 48 Stunden auf. In den beiden niedrigsten Konzentrationen waren jeweils fünf Embryonen (25 %) davon betroffen, in 123,2 mmol/L 18 Embryonen (90 %) und in den beiden höchsten Konzentrationen alle Embryonen. Die EC_{50} Herz-Kreislauf (48 h) beträgt 95,9 mmol/L ($b = 9,2$; $EC_{10} = 69,7$ mmol/L). Eine verringerte bzw. völlig fehlende Ausbildung von Melanocyten trat bei 15 Embryonen (75 %) in 72,9 mmol/L und bei 17 Embryonen (85 %) in 94,8 mmol/L auf. In den drei höchsten Konzentrationen waren alle Embryonen davon betroffen, wobei in 208,5 mmol/L sämtliche Embryonen keine Melanocyten gebildet hatten. Ein Kontrollembryo wies nach 48 Stunden ein Dotteroedem auf. Bei den exponierten Embryonen bestand für diesen Effekt keine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung.

Nach 48 Stunden wiesen in 72,9 mmol/L 17 Embryonen (85 %), in 94,8 mmol/L 19 Embryonen (95 %) und ab 123,2 mmol/L alle Embryonen subletale Effekte auf. Aufgrund dieser Datenlage ist es nicht zulässig eine EC_{50} subletal zu berechnen. Zur Einschätzung der Effekte wurde dennoch mittels Probit-Verfahren ein Wert von 53,3 mmol/L kalkuliert ($b = 7,1$; $EC_{10} = 35,2$ mmol/L). Ein Vertrauensbereich kann nicht angegeben werden (siehe Tab. 63). Diese Angabe ist entsprechend kritisch zu bewerten.

Als teratogene Effekte traten Deformationen der Chorda, des Schwanzes und der Schwanzspitze auf, wobei die beiden letzteren nur nach 48 Stunden beobachtet wurden. Eine veränderte Chordastruktur wurde bei den Embryonen festgestellt, die auch eine „zickzackförmige“ Chordadeformation im Körperbereich zeigten. Zusätzlich hatten acht Embryonen (40 %) in 123,2 mmol/L sowie alle Embryonen in den beiden höchsten Konzentrationen keine Sacculi angelegt. Zusammengefaßt wiesen in 72,9 mmol/L 16 Embryonen (80 %), in 94,8 mmol/L 18 Embryonen (90 %) und ab 123,2 mmol/L alle Embryonen teratogene Effekte auf. Wie bei den subletalen Effekten ist es auch in diesem Fall nicht zulässig, eine EC_{50} teratogen zu berechnen. Da aber χ^2 für die Homogenität gehalten werden konnte, wurde zum Vergleich der Effekte mittels Probit-Verfahren ein Wert von 55,9 mmol/L kalkuliert ($b = 6,6$; $EC_{10} = 35,8$ mmol/L). Die EC_{50} teratogen ist entsprechend der genannten Einschränkungen kritisch zu bewerten, zumal der 95 %ige Vertrauensbereich von 5,9 bis 70,0 mmol/L reicht (siehe Tab. 63).

Tab. 62: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Isoniazid auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	72,9	94,8	123,2	160,4	208,5
keine Spontanbewegung	24	–	2	2	3	2	17
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	1	–	7	13	19
	48	–	–	–	2	–	6
diffuse Augenanlage	24	–	–	1	–	5	9
	48	–	–	–	–	–	2
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	–	10
	48	–	–	–	–	–	–
kein Herzschlag	48	–	–	–	–	1	11
schwacher Blutkreislauf	48	–	2	4	7	–	–
kein Blutkreislauf	48	–	3	1	11	20	20
stark verringerte Pigmentierung	48	–	15	17	19	13	–
keine Pigmentierung	48	–	–	–	1	7	20
Dotterödem	48	1	7	–	1	2	–
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	7	5	5	8	19
	48	–	12	14	13	15	19
Chordadeformation (Körper)	24	–	16	18	19	19	19
	48	–	16	18	20	20	20
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	1	4	1	4	15
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	1	3	4	4
veränderte Chordastruktur	24	–	16	18	19	19	19
	48	–	16	18	20	20	20
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	8	20	20
Σ teratogen		0	16	18	20	20	20
Σ subletal		1	17	19	20	20	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Zur Beurteilung der Substanzwirkung auf das Längenwachstum, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. In den Kontrollen ließ die Larve, die als Embryo nach 48 Stunden ein Dotterödem aufwies, sowohl Dotter- als auch Perikardoedem erkennen und hatte keinen Blutkreislauf ausgebildet. Von den exponierten Embryonen war bis 120 Stunden nur einer aus der geringsten „Konzentration“ geschlüpft. Diese Larve wies neben einem Perikardoedem Deformationen der Chorda und des Schwanzes auf. Alle übrigen Embryonen waren im Chorion koaguliert und begannen zu lysieren. Teilweise waren die Körperstrukturen noch zu erkennen, so daß die nach 48 Stunden beobachteten teratogenen Effekte bestätigt werden konnten.

Da in der geringsten „Konzentration“ bereits 95 % der Embryonen abgestorben waren, liegt die LC₅₀ (120 h) unterhalb von 72,9 mmol/L. Durch die verlängerte Testzeit ergibt sich nach

Beendigung der Exposition im Vergleich mit der LC_{50} (48 h) ein Hinweis auf verzögert einsetzende letale Effekte von Isoniazid.

In Tab. 63 sind die berechneten LC_{50} bzw. EC_{50} zusammengestellt. Abb. 37 veranschaulicht den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die letalen Effekte und die Lage der beobachteten teratogenen Effekte.

Tab. 63: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Isoniazid

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	309,1 (293,0 – 326,1)
EC_{50} Entwicklungsverzögerung	24	134,2 (122,6 – 147,3)
EC_{50} Herz-Kreislauf	48	95,9 (86,9 – 104,8)
EC_{50} subletal	48	53,3 ^a
EC_{50} teratogen	48	55,9 (5,9 – 70,0) ^a
TI		5,53 ^a

a : Wert beruht nicht auf valider Berechnung

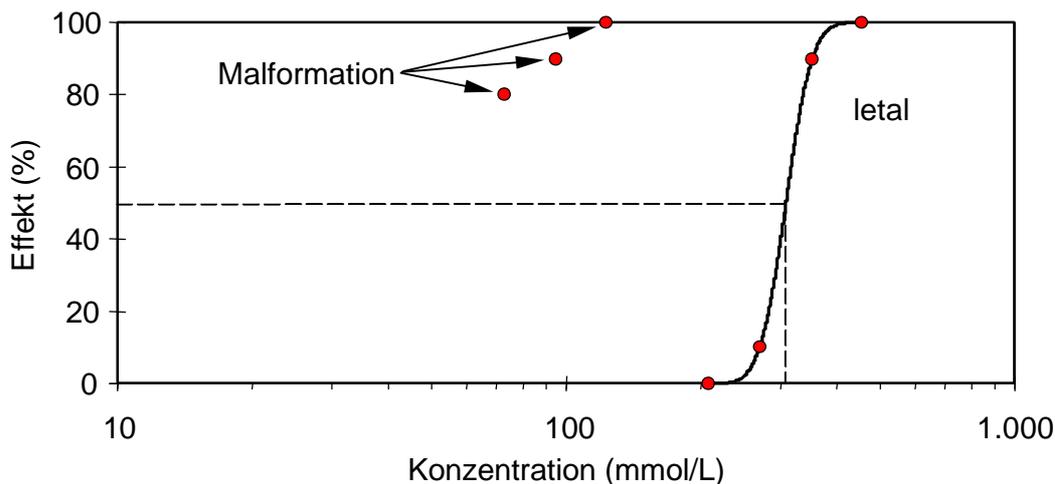


Abb. 37: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Isoniazid für die letalen Effekte und Lage der teratogenen Effekte

LC_{50} (48 h): 309,1 mmol/L

In Abb. 37 sind die teratogenen Effekte nur bis zur geringsten Konzentration mit 100 % Malformationen eingetragen. Die von Isoniazid verursachten letalen Effekte weisen eine steile Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ($b = 21,9$) auf. Diejenige für die teratogenen Effekte kann nicht abgeschätzt werden, da in der geringsten Konzentration bereits 80 % der Embryonen Malformationen aufwiesen. Die EC_{50} teratogen von 55,9 mmol/L ist entsprechend kritisch zu betrachten (siehe oben). Die Malformationen und die letalen Effekte sind deutlich voneinander getrennt. Der hohe Teratogenitätsindex TI von 5,53 bestärkt die Aussage, daß mit *DarT* für Isoniazid ein teratogenes Potential erkannt wurde.

Aus Untersuchungen mit Säugern liegen keine einheitlichen Ergebnisse vor. Lewis (2000) stuft Isoniazid als Substanz ein, die im Tierexperiment teratogene Effekte verursacht (Maus, oral, Gestationstag 1 – 21, TDLo: 1.848 mg/kg). Kalter (1972) applizierte Mäusen 100 bis 300 mg/kg (Gestationstag 7 – 12) und fand ab 170 mg/kg eine stark erhöhte maternale Toxizität. Bei 100 bis 150 mg/kg wurden die Embryonen verstärkt resorbiert. Sämtliche lebende Nachkommen wiesen keine teratogenen Effekte auf. Geringere Dosen hatten keinen Einfluß auf die Muttertiere bzw. Feten.

Shepard (1992) nennt verschiedene Studien, bei denen 10 bis 12 % der Neugeborenen von mit Isoniazid behandelten Schwangeren Malformationen aufwiesen, ohne auf die Art der Mißbildungen einzugehen. In einer Studie werden Enzephalopathien beschrieben, nachdem die Mütter während der Schwangerschaft mit Isoniazid behandelt wurden.

3.12 Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat

Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat wurde in den Konzentrationen 0,6; 0,9; 1,4; 2,1 und 3,2 $\mu\text{mol/L}$ untersucht. Sauerstoffsättigung, Osmolarität und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 19 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da nur bei einem Kontrollembryo (5 %) nach 36 Stunden ein Effekt auftrat (siehe Tab. 64 und Tab. 65).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 64 aufgeführt. In der höchsten Konzentration war bereits nach acht Stunden ein Embryo (5 %) abgestorben, nach 24 Stunden waren alle koaguliert. Bis zum Meßzeitpunkt nach 36 Stunden koagulierte in 1,4 $\mu\text{mol/L}$ ein (5 %) und in 2,1 $\mu\text{mol/L}$ zehn Embryonen (50 %). Bis zum Testende blieb deren Anzahl konstant. Die LC_{50} (48 h) beträgt 2,0 $\mu\text{mol/L}$ ($b = 11,2$; $\text{LC}_{10} = 1,6 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 64: Zusammenstellung der letalen Effekte von Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	0,6	0,9	1,4	2,1	3,2
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	1
	24	–	–	–	1	9	20
	36	–	–	–	1	10	20
	48	–	–	–	1	10	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 65 sind die subletalen Effekte zusammengestellt. Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat verursachte bereits frühzeitig eine Störung der Embryonalentwicklung. Nach 2,5 Stunden hatten in 1,4 und 2,1 $\mu\text{mol/L}$ jeweils zwei (10 %) sowie in 3,2 $\mu\text{mol/L}$ fünf Embryonen (25 %) keine hohe Blastula angelegt. Die Epibolie war nach acht Stunden ab 0,9 $\mu\text{mol/L}$ konzentrationsabhängig bei fünf bis 36,8 % der Embryonen gestört. In den folgenden 16 Stunden starben in den beiden höchsten Konzentrationen alle Embryonen ab, die diese Symptome aufwiesen. Ein Embryo in 1,4 $\mu\text{mol/L}$ koagulierte ebenfalls bis zum Meßzeitpunkt nach 24 Stunden. In 1,4 und 2,1 $\mu\text{mol/L}$ wurde beim Endpunkt „Schwanzablösung vom Dotter“ eine Entwicklungsverzögerung deutlich. Zu diesem Zeitpunkt ließen in 1,4 $\mu\text{mol/L}$

sechs (31,6 %) und in 2,1 $\mu\text{mol/L}$ acht Embryonen (72,7 %) keine Spontanbewegung erkennen. Für diesen Endpunkt wurde eine EC_{50} von 1,7 $\mu\text{mol/L}$ berechnet ($b = 7,9$; $\text{EC}_{10} = 1,2 \mu\text{mol/L}$). Sowohl nach 36 als auch nach 48 Stunden waren Herzschlag und Blutkreislauf beeinträchtigt. Die $\text{EC}_{50 \text{ Herz-Kreislauf}}$ (36 h) beträgt 1,8 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,900$; $b = 3,8$; $\text{EC}_{10} = 0,8 \mu\text{mol/L}$). Nach 48 Stunden wurden in allen Konzentrationen Oedeme beobachtet. Die $\text{EC}_{50 \text{ Herz-Kreislauf}}$ (48 h) entspricht der $\text{EC}_{50 \text{ subletal}}$ (48 h), allerdings liegen sie mit 2,5 $\mu\text{mol/L}$ über der LC_{50} (48 h). Aufgrund der Datenlage konnten nach 48 Stunden keine plausiblen Werte für $\text{EC}_{50 \text{ Herz-Kreislauf}}$ und $\text{EC}_{50 \text{ subletal}}$ berechnet werden. In Abb. 38 sind die Herzschlagfrequenzen der Embryonen dargestellt. Eine Reduktion der Herzschlagfrequenz wird bereits in der geringsten Konzentration von 0,6 $\mu\text{mol/L}$ deutlich. Eine signifikante Reduktion wurde ab 1,4 $\mu\text{mol/L}$ nachgewiesen, wobei die Mediane von 2,1 und 1,4 $\mu\text{mol/L}$ gleich sind. In der Konzentration von 2,1 $\mu\text{mol/L}$ gingen nur sechs Embryonen in die Auswertung ein, so daß diese Angabe kritisch zu bewerten ist.

Tab. 65: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	0,6	0,9	1,4	2,1	3,2
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	2	2	5
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	2	1	1
keine Gastrulation	8	–	–	–	–	1	1/19
verzögerte Gastrulation	8	–	–	1	2	3	6/19
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	6/19	8/11	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	2/19	3/11	†
	36	–	–	–	1/19	2/10	†
	48	–	–	–	–	–	†
schwacher Herzschlag	36	–	–	1	1/19	–	†
	48	–	–	–	–	2/10	†
kein Herzschlag	36	–	–	–	–	3/10	†
	48	–	–	–	–	1/10	†
schwacher Blutkreislauf	36	1	1	1	2/19	3/10	†
	48	–	1	–	1/19	3/10	†
kein Blutkreislauf	36	–	–	1	2/19	4/10	†
	48	–	–	–	–	1/10	†
Dotteroedem	48	–	2	2	3/19	2/10	†
Perikardoedem	48	–	1	2	1/19	1/10	†
Σ teratogen		0	0	0	0	0	0
Σ subletal		0	2	3	4/19	5/10	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

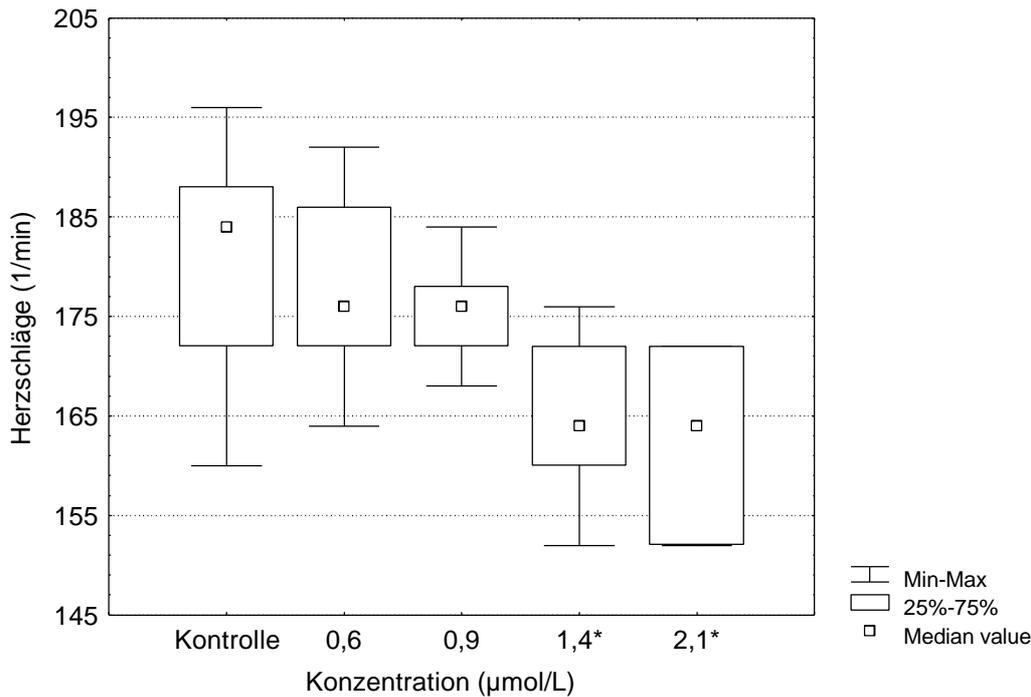


Abb. 38: Wirkung von Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$)

NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz: 0,9 / 1,4 µmol/L

Teratogene Effekte wurden nicht verursacht. Die Schwanzlängen der Larven wurden nicht untersucht. Die berechneten EC_{50} , LC_{50} und NOEC / LOEC sind in Tab. 66 zusammengestellt.

Tab. 66: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat

	Zeit (h)	µmol/L
LC_{50}	48	2,0 (1,8 – 2,3)
EC_{50} Spontanbewegung	24	1,7 (1,5 – 2,1)
EC_{50} Herz-Kreislauf	36	1,8 (1,3 – 2,5)
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	0,9 / 1,4

Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat zeigte im *DarT* kein teratogenes Potential. Die Substanz störte die frühen Phasen der Ontogenese von *D. rerio* und führte somit zum Absterben der Embryonen. Neben einer leichten Entwicklungsverzögerung wurde das Herz-Kreislaufsystem relativ stark beeinträchtigt.

Bei Säugetieren sind keine durch Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat verursachten teratogenen Effekte bekannt (Lewis, 2000). Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* geben hinsichtlich der Teratogenität die Verhältnisse beim Säuger wieder.

3.13 D-Mannitol

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurden folgende Konzentrationen untersucht: 109,8; 154,0; 214,6; 301,8 und 421,7 mmol/L. Im Kontrollmedium und in den Testlösungen lagen Sauerstoffsättigung und pH-Werte in dem für den Test zulässigen Bereich. Die ermittelten Werte für die Osmolarität ließen Auswirkungen auf die Embryonen erwarten. Darauf wird weiter unten im Zusammenhang mit den subletalen Effekten eingegangen. Die Meßwerte sind in Tab. A 20 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da in den Kontrollen nicht mehr als 5 % der Embryonen Effekte aufwiesen (siehe Tab. 67 und Tab. 68). Die während des Testzeitraumes koagulierten Embryonen sind in der Tab. 67 aufgeführt. Nur in der höchsten Konzentration von 421,7 mmol/L traten 40 % tote Embryonen auf. Mit diesen Daten war eine Berechnung der LC₅₀ nicht möglich. Aus dem „range finder“-Versuch ist aber bekannt, daß in 548,9 mmol/L bereits 100 % letale Effekte auftraten. Der Faktor zwischen diesen beiden Konzentrationen beträgt 1,3. Vor diesem Hintergrund wurde davon abgesehen, die Datenlage durch einen weiteren Test zu verbessern. Mittels der "Trimmed Spearman-Kärber" Methode wurde unter Berücksichtigung der letalen Effekte des „range finders“ eine LC₅₀ (48 h) von 426,9 mmol/L berechnet. Vernachlässigt wurde, daß zwischen den ersten fünf Konzentrationen ein Faktor von 1,4, zwischen der fünften und „sechsten“ Konzentration (range finder) aber ein Faktor von 1,3 liegt.

Tab. 67: Zusammenstellung der letalen Effekte von D-Mannitol

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	109,8	154,0	214,6	301,8	421,7
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	–	8
	48	–	–	–	–	–	8

In 109,8 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 68 sind die subletalen Effekte aufgeführt. Nach 2,5 Stunden hatten vor allem in der höchsten Konzentration Embryonen Bläschen abgeschnürt (60 %). Die meisten dieser Embryonen starben innerhalb der nächsten 20 Stunden ab. Die Bläschenbildung an Dotter und Blastomeren beruht vermutlich auf der osmotischen Wirkung der Substanz. Lange et al. (1995) geben für eine Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung durch Harnstoff und Natriumchlorid einen Wert von 100 mOsmol/L an. In dem vorliegenden Versuch wurden auch in den vier geringeren Konzentrationen Osmolaritäten bestimmt, die über 100 mOsmol/L lagen. Bis auf einen Embryo in 301,8 mmol/L, der ebenfalls Bläschen abgeschnürt hatte, wurden jedoch keine weiteren osmotischen Effekte beobachtet.

Nach 24 Stunden wurden nur in der höchsten Konzentration Effekte beobachtet. Fünf Embryonen (41,7 %) hatten keine Somiten angelegt. Alle zwölf lebenden Embryonen hatten den Schwanz nicht abgelöst, ließen keine Spontanbewegung erkennen und zeigten eine gestörte Entwicklung der Augenanlage. In den folgenden 24 Stunden wurden diese Fehlentwicklungen teilweise aufgehoben. Nach 48 Stunden konnte aber bei keinem der Embryonen in 421,7 mmol/L Herzschlag festgestellt werden. Außer in 154,0 mmol/L wurde bei Embryonen aller Konzentrationen eine Störung des Herz-Kreislaufsystems mit der

Ausprägung von Oedemen beobachtet. In den beiden geringsten Konzentrationen bestand keine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und ein Kontrollembryo wies ein Dotteroedem auf. Mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode konnte für die Störung des Herz-Kreislaufsystems nach 48 Stunden eine EC_{50} von 288,1 mmol/L berechnet werden. Dieser Wert entspricht der EC_{50} subletal (48 h).

Tab. 68: Zusammenstellung der subletalen Effekte von D-Mannitol auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	109,8	154,0	214,6	301,8	421,7
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	–	–	3
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	–	1	12
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	–	–	12/12
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	–	–	5/12
	48	–	–	–	–	–	5/12
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	–	12/12
	48	–	–	–	–	–	10/12
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	–	7/12
	48	–	–	–	–	–	6/12
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	–	5/12
	48	–	–	–	–	–	–
kein Herzschlag	48	–	–	–	–	–	12/12
schwacher Blutkreislauf	48	–	1/19	–	–	–	–
kein Blutkreislauf	48	–	–	–	1	13	12/12
Dotteroedem	48	1	1/19	–	1	2	7/12
Perikardoedem	48	–	2/19	–	1	–	–
<i>Malformationen:</i>							
Schwanzdeformation	48	–	–	–	–	–	4/12
deformierte Schwanzspitze	48	–	–	–	–	–	1/12
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	–	–	1/12
Σ teratogen		0	0	0	0	0	5/12
Σ subletal		1	2/19	0	1	13	12/12

In 109,8 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Teratogene Effekte traten nur in der höchsten Konzentration auf. Bei vier der zwölf lebenden Embryonen (33,3 %) dieser Konzentration wurden Deformationen des Schwanzes bzw. der Schwanzspitze festgestellt. Ein Embryo (8,3 %) hatte keine Sacculi ausgebildet.

Da nur in der höchsten Konzentration bei 41,7 % der Embryonen teratogene Effekte auftraten, konnte keine LC_{50} teratogen berechnet werden. Es bestand kein Hinweis auf eine Reduktion der Schwanzlänge. Die berechneten LC_{50} bzw. EC_{50} sind in Tab. 69 aufgeführt.

Tab. 69: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für D-Mannitol

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀ ^a	48	426,9 (399,8 – 455,8)
EC ₅₀ Herz-Kreislauf	48	288,1 (267,9 – 310,0)
EC ₅₀ subletal	48	288,1 (267,9 – 310,0)

a : berechnet aus der Anzahl koagulierter Embryonen zweier Teste

Malformationen und letale Effekte traten in 421,7 mmol/L zu vergleichbaren Anteilen auf (41,7 bzw. 40 %). In der nächst geringeren Konzentration von 301,8 mmol/L wurden weder letale noch teratogene Effekte festgestellt. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen verlaufen steil, das heißt die entsprechenden Effekte treten nur in einem kleinen Konzentrationsbereich auf. Zudem überlagern die letalen Effekte mögliche Malformationen. Inwieweit die hohen Konzentrationen toxikologisch und ökotoxikologisch relevant sind, muß in diesem Fall kritisch hinterfragt werden. Obwohl Malformationen bei Embryonen von *D. rerio* beobachtet wurden, kann vor dem Hintergrund des sich ergebenden Bildes davon ausgegangen werden, daß D-Mannitol kein teratogenes Potential besitzt.

Beim Säuger gibt es keine Hinweise auf durch D-Mannitol verursachte teratogene Effekte (Lewis, 2000). Nach Shepard (1992) verursacht Mannitol beim Kaninchen eine Gewichtsreduktion der Feten, ohne Malformationen zu verursachen.

3.14 3-Methyl-1-butanol

Nach zwei Vorversuchen wurden die Konzentrationen 4,4; 5,7; 7,4; 9,6 und 12,5 mmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität lagen sowohl im Kontrollmedium als auch in den Testlösungen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind der Tab. A 25 (Anhang A) zu entnehmen. Der Test ist valide, da nicht mehr als 5 % der Kontrollembryonen Effekte erkennen ließen (siehe Tab. 70 und Tab. 71).

Die Anzahl der innerhalb von 48 Stunden koagulierten Embryonen ist in Tab. 70 aufgeführt. Nur in der höchsten untersuchten Konzentration von 12,5 mmol/L wurden koagulierte Embryonen festgestellt, wobei sich deren Anzahl nach 24 Stunden nur um 5 % erhöhte. Die LC₅₀ (48 h) beträgt 12,2 mmol/L (Berechnung nach "Trimmed Spearman-Kärber").

Tab. 70: Zusammenstellung der letalen Effekte von 3-Methyl-1-butanol

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	4,4	5,7	7,4	9,6	12,5
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	–	10
	36	–	–	–	–	–	10
	48	–	–	–	–	–	11

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 71 sind die durch 3-Methyl-1-butanol verursachten subletalen Effekte zusammengestellt. Nach 24 Stunden wurden konzentrationsabhängig Embryonen beobachtet, die keine Spontanbewegung erkennen ließen. Für diese physiologische Störung beträgt die EC_{50} 4,5 mmol/L ($R^2 = 0,884$; $b = 3,5$; $EC_{10} = 1,9$ mmol/L). Betrachtet man die Entwicklung der Augenanlagen und die Ablösung des Schwanzes vom Dotter, läßt sich in den beiden höchsten Konzentrationen eine Verzögerung der Entwicklung zwischen 24 und 48 Stunden erkennen. Die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems ist nach 36 Stunden in allen Konzentrationen bei 10 % bis 100 % der lebenden Embryonen verzögert. Die aus der Störung des Herz-Kreislaufsystems zu berechnende EC_{50} beträgt nach 36 Stunden 6,0 mmol/L ($R^2 = 0,984$; $b = 10,1$; $EC_{10} = 4,4$ mmol/L). Nach 48 Stunden läßt sich dafür ein Wert von 6,5 mmol/L berechnen ($R^2 = 0,999$; $b = 9,5$; $EC_{10} = 4,7$ mmol/L). Im Zusammenhang mit der Beeinträchtigung des Herzschlages steht vermutlich die Bildung von Oedemen am Dotter bzw. im Bereich des Perikards. Die $EC_{50 \text{ Oedeme}}$ (48 h) beträgt 5,0 mmol/L ($R^2 = 0,991$; $b = 7,8$; $EC_{10} = 3,4$ mmol/L) und entspricht der $EC_{50 \text{ subletal}}$ für die Summe der subletalen Effekte. In der höchsten Konzentration wiesen 88,9 % der lebenden Embryonen eine gestörte Pigmentierung auf. In 9,6 mmol/L zeigte nur ein Embryo (5 %) eine stark verringerte Bildung von Melanocyten.

Für eine durch 3-Methyl-1-butanol verursachte Störung des Herz-Kreislaufsystems spricht ebenfalls die Reduktion der Herzschlagfrequenz (Abb. 39). Bereits ab 5,7 mmol/L läßt sich eine Konzentrationsabhängigkeit erkennen. Ab 9,6 mmol/L war die Herzschlagfrequenz signifikant reduzierte ($p = 0,05$). In dieser Konzentration zeigten sowohl nach 36 Stunden, wie auch nach 48 Stunden alle Embryonen eine deutliche Störung von Herzschlag und Blutkreislauf in Zusammenhang mit der Ausbildung von Oedemen.

Tab. 71: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 3-Methyl-1-butanol auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	4,4	5,7	7,4	9,6	12,5
keine Spontanbewegung	24	1	9	14	15	20	10/10
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	–	–	1/10
	36	–	–	–	–	–	1/10
	48	–	–	–	–	–	–
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	–	3	4/10
	36	–	–	–	–	3	7/10
	48	–	–	–	–	1	3/9
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	–	5/10
	36	–	–	–	–	–	2/10
	48	–	–	–	–	–	–
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	–	4/10
	36	–	–	–	–	–	5/10
	48	–	–	–	–	–	–
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	–	2/10
	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	–	–

Fortsetzung Tab. 71

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	4,4	5,7	7,4	9,6	12,5
kein Herzschlag	36	–	–	–	2	8	10/10
	48	–	–	–	–	3	4/9
schwacher Blutkreislauf	36	–	1	1	2	1	–
	48	–	–	2	4	–	–
kein Blutkreislauf	36	–	1	6	15	19	10/10
	48	–	1	4	10	19	9/9
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	–	1	6/9
keine Pigmentierung	48	–	–	–	–	–	2/9
Dotterödem	48	–	6	13	17	20	8/9
Perikardoedem	48	–	1	7	8	16	3/9
<i>Malformationen:</i>							
keine Kopfanlage	24	–	–	–	–	–	1/10
	36	–	–	–	–	–	1/10
	48	–	–	–	–	–	–
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	–	2/9
Σ teratogen		0	0	0	0	0	2/9
Σ subletal		0	6	14	18	20	9/9

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

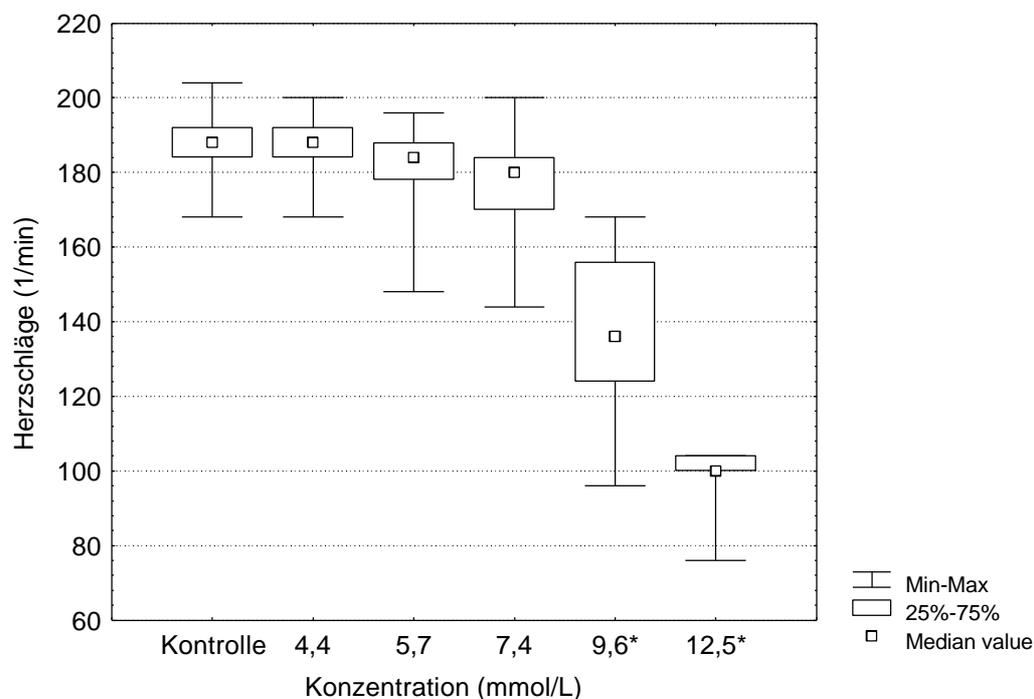


Abb. 39: Wirkung von 3-Methyl-1-butanol auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert (p = 0,05); NOEC / LOEC_{reduzierte Herzschlagfrequenz}: 7,4 / 9,6 mmol/L

Im Verlauf des Testes hatte nach 24 und 36 Stunden in der höchsten Konzentration ein Embryo keine Somiten und keine Kopfanlage ausgebildet und koagulierte bis nach 48 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt wurden in dieser Konzentration, in der die letalen Effekte überwogen, zwei Embryonen (22,2 %) mit moderater Deformation der Schwanzspitze beobachtet. Eine $EC_{50 \text{ teratogen}}$ konnte bei dieser Datenlage nicht berechnet werden.

Da nicht eindeutig abzuschätzen war, ob eine mögliche Reduktion der Schwanzlänge vorlag, wurden die Embryonen in unbelastetes Medium überführt und nach 120 Stunden die Larven untersucht. Die beobachteten Effekte sind in Tab. 72 aufgeführt.

Tab. 72: Zusammenstellung der Effekte von 3-Methyl-1-butanol auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 Stunden

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	4,4	5,7	7,4	9,6	12,5
koaguliert ^a	120	–	–	1	1	2	14
kein Herzschlag	120	–	–	–	–	3/18	2/6
kein Blutkreislauf	120	–	2	1/19	2/19	10/18	6/6
Dotteroedem	120	1	–	–	2/19	5/18	–
Perikardoedem	120	–	3	1/19	2/19	10/18	6/6
<i>Malformationen:</i> verkrümmter Schwanz	120	–	–	–	–	–	2/6
Σ teratogen		0	0	0	0	0	2/6
Σ subletal		1	3	1/19	2/19	10/18	6/6

Anzahl der Larven je „Konzentration“ n = 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : koagulierte und nicht geschlüpfte Embryonen zusammengefaßt

In 5,7 mmol/L war ein Embryo nicht geschlüpft, in 9,6 mmol/L zwei und in 12,5 mmol/L 3 Embryonen. Da diese Embryonen koaguliert waren und die Lyse eingesetzt hatte, gingen sie mit in die Berechnung der LC_{50} ein. Die LC_{50} (120 h) beträgt 11,6 mmol/L ($R^2 = 0,993$; $b = 18,7$; $LC_{10} = 9,9$ mmol/L) und liegt damit im Bereich der LC_{50} (48 h). Nach Beendigung der Exposition ergaben sich bei 3-Methyl-1-butanol keine deutlichen Hinweise auf verzögert auftretende letale Effekte.

In allen Konzentrationen traten Larven auf, die eine Störung des Herz-Kreislaufsystems mit Oedembildung aufwiesen. Ein Kontrollembryo hatte ein Dotteroedem ausgebildet. Für die gesamten subletalen Effekte nach 120 Stunden kann eine EC_{50} von 9,5 mmol/L angegeben werden (Berechnung nach „Trimmed Spearman-Kärber“).

Die Schwanzlängen der Larven waren nach 120 Stunden in keiner der auswertbaren Konzentrationen signifikant ($p = 0,05$) reduziert (siehe Abb. 40). Zwei Larven der höchsten Konzentration, die nach 48 Stunden den Schwanz nicht vollständig abgelöst bzw. eine deformierte Schwanzspitze hatten, ließen jetzt einen verkrümmten Schwanz erkennen. Weitere teratogene Effekte traten nicht auf.

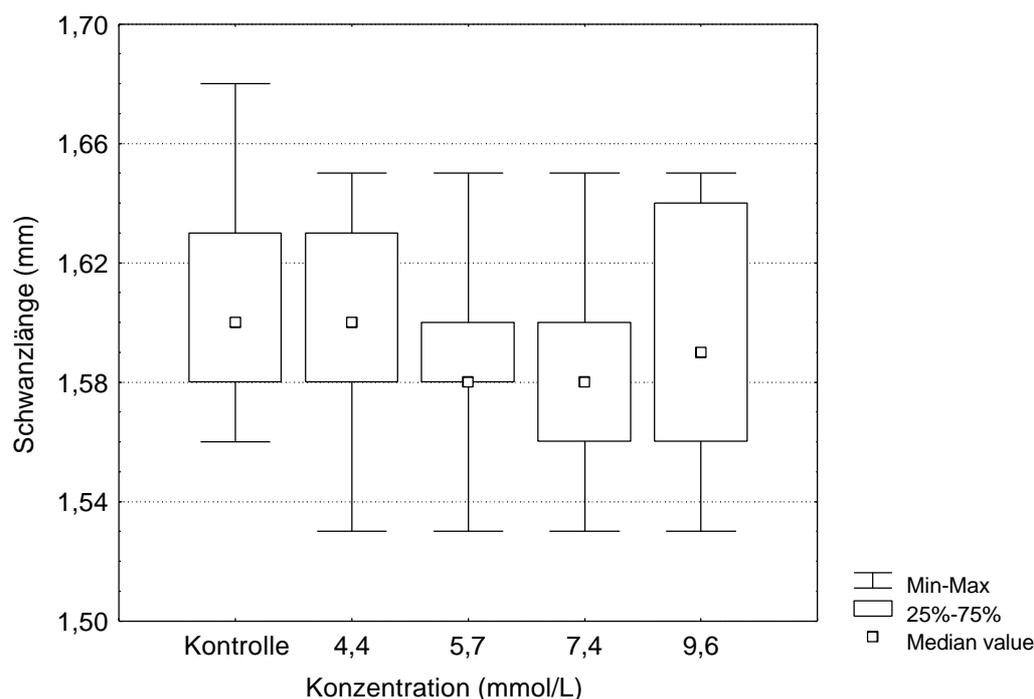


Abb. 40: Wirkung von 3-Methyl-1-butanol auf die Längenentwicklung des Schwanzes

In Tab. 73 sind die berechneten LC_{50} , EC_{50} und $NOEC / LOEC$ zusammengestellt. Abb. 41 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die letalen Effekte. In diese Abbildung sind zusätzlich die teratogenen Effekte eingetragen.

Tab. 73: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 3-Methyl-1-butanol

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	12,2
LC_{50}	120	11,6 (10,9 – 12,3)
EC_{50} Spontanbewegung	24	4,5 (3,3 – 6,1)
EC_{50} Herz-Kreislauf	36	6,0 (5,5 – 6,5)
EC_{50} Herz-Kreislauf	48	6,5 (5,9 – 7,1)
EC_{50} Oedeme	48	5,0 (4,5 – 5,6)
EC_{50} subletal	48	5,0 (4,5 – 5,6)
EC_{50} subletal	120	9,5 (8,7 – 10,2)
$NOEC / LOEC$ reduzierte Herzschlagfrequenz	48	7,4 / 9,6
$NOEC / LOEC$ reduzierte Schwanzlänge	120	9,6 / –

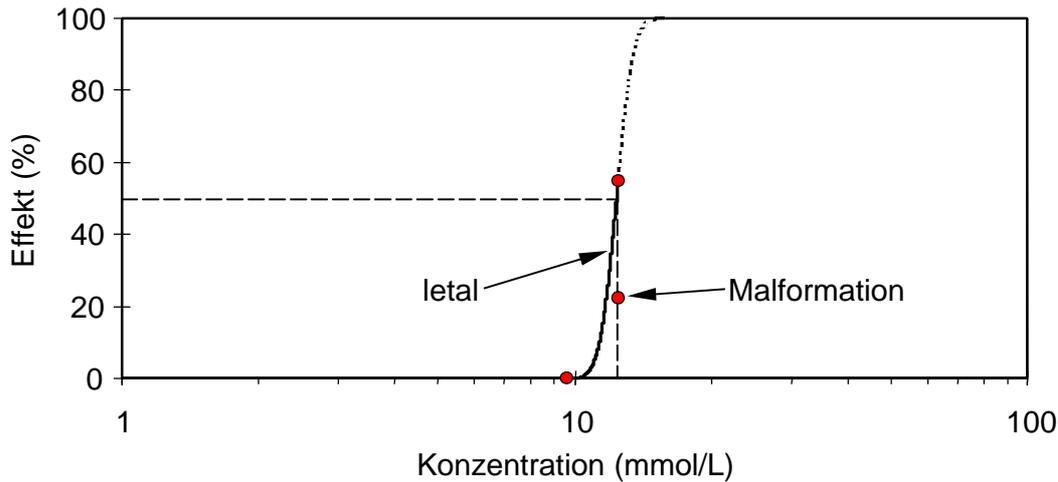


Abb. 41: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von 3-Methyl-1-butanol für die letalen Effekte und Lage der teratogenen Effekte

LC₅₀ (48 h): 12,2 mmol/L

In Abb. 41 ist die Sigmoidale für die letalen Effekte im oberen Bereich gestrichelt dargestellt, da in der höchsten untersuchten Konzentration nur 55 % letale Effekte auftraten und der Kurvenverlauf zudem anhand von nur zwei Punkten erstellt wurde. Die eingetragene Lage der Malformationen macht deutlich, daß diese von der Letalität überdeckt werden. Mißbildungen traten nur in der höchsten Konzentration auf, in der letale Effekte überwogen. Ein Quotient aus LC₅₀ und „fiktiver“ EC₅₀ teratogen wäre kleiner als 1. Im *DarT*-System läßt sich kein Hinweis auf ein teratogenes Potential von 3-Methyl-1-butanol erkennen.

In der Literatur sind keine durch 3-Methyl-1-butanol beim Säuger verursachten teratogenen Effekte bekannt.

3.15 Methylformamide und Metabolite

N,N-Dimethylformamid wird beim Säuger in der Leber durch mikrosomale Enzymsysteme metabolisiert. Als Hauptmetabolit entsteht N-Hydroxymethyl-N-Methylformamid, als weiterer Metabolit in geringerem Maße N-Methylformamid. Als intermediäre Spezies entstehen Glutathion- und Cystein-Addukte, die bis hin zum N-Acetyl-(N-methylcarbamoyl)cystein metabolisiert werden. Diesen über den „Glutathion-Pfad“ entstehenden Metaboliten kommt die eigentliche entwicklungstoxische Aktivität zu (Klug et al., 1998). Die Substanzen werden spezies- und applikationsabhängig überwiegend über den Urin ausgeschieden; z.B. N-Acetyl-(N-methylcarbamoyl)cystein beim Menschen nach inhalativer Exposition: 10 – 23 % (BUA 84, 1992). Im *DarT* wurden N,N-Dimethylformamid, N-Methylformamid, Methylcarbamoylglutathion und Methylcarbamoylcystein untersucht.

3.15.1 N,N-Dimethylformamid

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde N,N-Dimethylformamid in den Konzentrationen 54,7; 71,1; 92,5; 120,2 und 156,3 mmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test

zulässigen Bereich. Die ermittelten Werte für die Osmolarität in den drei niedrigen Konzentrationen ließen keine Auswirkungen auf die Embryonen erwarten. In 120,2 und 156,3 mmol/L wurden Werte über der von Lange et al. (1995) angegebenen Grenze von 100 mOsmol/L gemessen. In diesen beiden Konzentrationen konnten osmotische Effekte auf die Embryonen nicht ausgeschlossen werden. Die Werte sind in Tab. A 10 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da die Kontrolleembryonen keine Effekte aufwiesen (siehe Tab. 74 und Tab. 75).

Koagulierte Embryonen traten nur in der höchsten untersuchten Konzentration auf (Tab. 74). Die LC_{50} (48 h) beträgt 137,1 mmol/L (geometrisches Mittel).

Tab. 74: Zusammenstellung der letalen Effekte von N,N-Dimethylformamid

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	54,7	71,1	92,5	120,2	156,3
koaguliert	8	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	–	1
	48	–	–	–	–	–	20

In 54,7 mmol/L und in 92,5 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 75 sind die subletalen Effekte zusammengestellt. Nach acht bzw. nach 24 Stunden wurde bei Embryonen in den drei höchsten Konzentrationen eine Verzögerung der Gastrulation festgestellt. Osmotische Effekte in Form von abgeschnürten Bläschen wurden nicht beobachtet. Das Nichtablösen des Schwanzes und eine gestörte Augenentwicklung vor allem in 120,2 mmol/L sind ebenfalls Hinweise auf eine physiologische Störung, die sich als Entwicklungsverzögerung darstellt. Für den nach 48 Stunden beobachteten Effekt „kein Blutkreislauf“ kann eine EC_{50} von 85,6 mmol/L errechnet werden ($b = 14,6$; $EC_{10} = 69,9$ mmol/L). Die bis 120,2 mmol/L in allen Konzentrationen beobachtete Ausbildung von Oedemen stellt einen empfindlicheren Endpunkt dar. Die $EC_{50 \text{ Oedeme}}$ beträgt 74,0 mmol/L ($R^2 = 0,996$; $b = 9,9$; $EC_{10} = 54,9$ mmol/L). Aus den gesamten subletalen Effekten errechnet sich nach 48 Stunden eine $EC_{50 \text{ subletal}}$ von 69,6 mmol/L ($R^2 = 0,995$; $b = 12,6$; $EC_{10} = 55,1$ mmol/L).

Tab. 75: Zusammenstellung der subletalen Effekte von N,N-Dimethylformamid auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	54,7	71,1	92,5	120,2	156,3
verzögerte Gastrulation	8	–	–	–	1/19	6	16
Gastrulation nicht beendet	24	–	–	–	–	2	19/19
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	–	14	–
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	2	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	3	–
	48	–	–	–	–	2	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	1/19	12	–
	48	–	–	–	–	1	–
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	3	–
	48	–	–	–	–	1	†
kein Herzschlag	48	–	–	–	–	1	†
kein Blutkreislauf	48	–	–	3	12/19	20	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	–	17	†
Dotteroedem	48	–	2/19	8	13/19	20	†
Perikardoedem	48	–	–	1	7/19	3	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	5	–
	48	–	–	–	1/19	6	†
Chordadeformation (Körper)	24	–	–	2	5/19	1	–
	48	–	–	2	6/19	2	†
keine Chorda angelegt	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	2	†
Kopfdeformation	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	2	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	1/19	11	–
	48	–	–	–	1/19	11	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	1/19	1	–
	48	–	–	–	1/19	2	†
Spaltembryo	24	–	–	–	1/19	9	–
	48	–	–	–	1/19	9	†
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	–	1	†
Σ teratogen		0	0	2	8/19	18	†
Σ subletal		0	2/19	10	18/19	20	†

In 54,7 mmol/L und in 92,5 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Teratogene Effekte wurden vor allem in 92,5 und 120,2 mmol/L beobachtet. Aber auch in 71,1 mmol/L wiesen 2 Embryonen (10 %) Deformationen der Chorda im Körperbereich auf. Die ansonsten beobachteten Malformationen reichten von moderat ausgeprägten

Deformationen der Schwanzspitze bis hin zu starken Effekten wie Kopfdeformationen und die Ausprägung einer Medianspalte (getrennte Längshälften des Körpers im Bereich des Urmundes). Dieser als „Spaltembryo“ bezeichnete Effekt findet sich zu 5,3 % in 92,5 mmol/L bzw. zu 45 % in 120,2 mmol/L. In dieser Konzentration hatten zwei Embryonen (10 %) keine Somiten angelegt und demzufolge keine Chorda ausgebildet. Die EC_{50} (48 h) für die teratogenen Effekte beträgt 93,8 mmol/L ($R^2 = 0,992$; $b = 11,2$; $EC_{10} = 72,1$ mmol/L). In Tab. 76 sind die berechneten Werte zusammengestellt, Abb. 42 verdeutlicht die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die teratogenen und die letalen Effekte.

Tab. 76: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für N,N-Dimethylformamid

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	137,1
EC_{50} Blutkreislauf	48	85,6 (79,6 – 92,1)
EC_{50} Oedeme	48	74,0 (67,8 – 80,8)
EC_{50} subletal	48	69,6 (64,6 – 74,9)
EC_{50} teratogen	48	93,8 (86,7 – 101,4)
TI		1,46

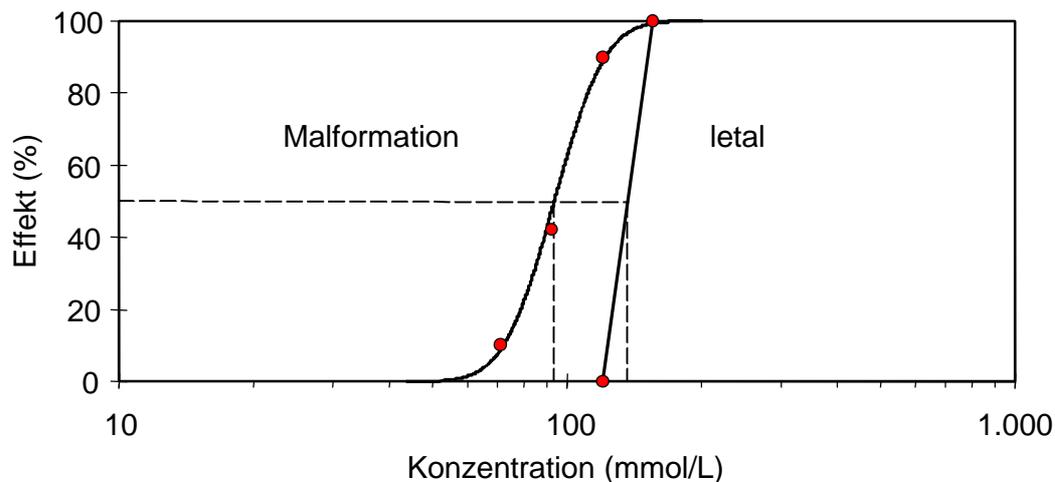


Abb. 42: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von N,N-Dimethylformamid für die teratogene und letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 137,1 mmol/L; EC_{50} teratogen (48 h): 93,8 mmol/L

Die als Gerade dargestellte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der letalen Effekte verläuft steiler als die Sigmoide für die Malformationen. Im mittleren Bereich (50 % Effekte) sind Sigmoide bzw. Gerade deutlich voneinander getrennt und liegen relativ weit auseinander. Der aus der LC_{50} und EC_{50} teratogen gebildete Quotient (Teratogenitätsindex TI) von 1,46 verdeutlicht das. Teratogene Effekte wurden im subletalen Konzentrationsbereich verursacht, und sind somit vom Bereich der letalen Wirkung deutlich getrennt. N,N-Dimethylformamid zeigte im *DarT* ein teratogenes Potential. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.15.5 (Seite 124) dargestellt.

3.15.2 N-Methylformamid

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurde N-Methylformamid in den Konzentrationen 135,4; 189,6; 265,8; 372,4 und 519,7 mmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen zu Versuchsbeginn in dem für den Test zulässigen Bereich. In allen Konzentrationen wurden für die Osmolarität Werte über der von Lange et al. (1995) genannten Grenze von 100 mOsmol/L ermittelt. Osmotische Effekte konnten demzufolge nicht ausgeschlossen werden, obwohl weder an den Blastomeren noch am Dotter Bläschenbildung beobachtet wurde. Die Meßwerte sind in Tab. A 28 (Anhang A) zusammengestellt. Der ist Test valide, da die Kontrollembryonen keine Effekte aufwiesen (siehe Tab. 77 und Tab. 78).

Innerhalb der 48-stündigen Exposition sank der pH-Wert der Testlösungen stark ab. Bei der Interpretation der Testergebnisse muß berücksichtigt werden, daß ein pH-Wert unter 4,5 schädigende Wirkung auf die Embryonen haben kann (Schulte, 1997). Das betrifft die beiden höchsten Konzentrationen. Ob das Absinken der pH-Werte durch den Metabolismus der Substanz und damit verbundener Ansäuerung des Mediums verursacht wurde, wurde nicht untersucht.

In Tab. 77 ist die Anzahl der koagulierten Embryonen zusammengestellt. In den beiden höchsten Konzentrationen war eine zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte zu erkennen. Die LC_{50} (48 h) beträgt 377,8 mmol/L ($R^2 = 0,993$; $b = 25,5$; $LC_{10} = 336,6$ mmol/L).

Tab. 77: Zusammenstellung der letalen Effekte von N-Methylformamid

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	135,4	189,6	265,8	372,4	519,7
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	5	17
	48	–	–	–	–	6	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 78 sind die subletalen Effekte aufgeführt. Bereits nach acht Stunden deutete sich in den beiden höchsten Konzentrationen bei 55 % bzw. 95 % der Embryonen eine Störung der frühen Entwicklungsphasen an. Bis zum Meßzeitpunkt nach 24 Stunden starben in 372,4 mmol/L 25 %, in 519,7 mmol/L 85 % der Embryonen ab. Bei einem Großteil der lebenden Embryonen in diesen beiden Konzentrationen wurde keine Spontanbewegung festgestellt. Die gestörte Entwicklung der Augen bzw. das Nichtablösen des Schwanzes vom Dotter nach 24 Stunden weisen hier auf eine Entwicklungsverzögerung hin. Betrachtet man die Endpunkte „Herzschlag“ und „Blutkreislauf“ wird nach 48 Stunden eine konzentrationsabhängige Störung des Herz-Kreislaufsystems deutlich. Die EC_{50} für diese Effekte beträgt 195,0 mmol/L ($R^2 = 0,978$; $b = 12,1$; $LC_{10} = 152,9$ mmol/L). Für die in allen Konzentrationen (außer 519,7 mmol/L) vermehrt aufgetretenen Oedeme läßt sich eine EC_{50} (48 h) von 160,8 mmol/L ($b = 8,7$; $LC_{10} = 114,6$ mmol/L) berechnen. Dieser Wert entspricht der EC_{50} subletal für die gesamten subletalen Effekte nach 48 Stunden.

Tab. 78: Zusammenstellung der subletalen Effekte von N-Methylformamid auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	135,4	189,6	265,8	372,4	519,7
keine Gastrulation	8	–	–	–	–	2	15
verzögerte Gastrulation	8	–	–	–	–	9	4
Gastrulation nicht beendet	24	–	–	–	–	–	1/3
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	–	14/15	2/3
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	5/15	2/3
	48	–	–	–	–	4/14	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	5/15	–
	48	–	–	–	–	4/14	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	3/15	2/3
	48	–	–	–	–	1/14	†
kein Herzschlag	48	–	–	–	–	12/14	†
schwacher Blutkreislauf	48	–	–	1	–	–	†
kein Blutkreislauf	48	–	1	6	18	14/14	†
Dotteroedem	48	–	4	9	17	13/14	†
Perikardoedem	48	–	5	12	11	7/14	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	2	–	–
	48	–	–	–	4	6/14	†
Kopfdeformation	24	–	–	–	–	–	2/3
	48	–	–	–	–	–	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	6/15	–
	48	–	–	–	–	6/14	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	1	6/14	†
Spaltembryo	24	–	–	–	–	4/15	1/3
	48	–	–	–	–	4/14	†
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	–	9/14	†
Σ teratogen		0	0	0	4	13/14	†
Σ subletal		0	6	13	20	14/14	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Im Verlaufe des Testes traten zum Teil massive Mißbildungen der Embryonen auf. Teratogene Effekte wurden vor allem in 265,8 mmol/L und 372,4 mmol/L festgestellt. Es fanden sich Embryonen mit Deformationen des Schwanzes, der Schwanzspitze und der Chorda im Schwanzbereich, wie auch Embryonen mit offenem Medianspalt (Spaltembryo). Zwei der nach 24 Stunden noch lebenden drei Embryonen der höchsten Konzentration hatten eine deformierte Kopfanlage. Einer der beiden zeigte zusätzlich die Symptome eines Spaltembryo. Innerhalb der nächsten 24 Stunden koagulierten diese Embryonen. Nach 48 Stunden hatten 64,3 % der Embryonen in 372,4 mmol/L weder Sacculi noch Otolithen

ausgebildet. Für die teratogenen Effekte wurde eine EC_{50} (48 h) von 303,9 mmol/L errechnet ($R^2 = 0,996$; $b = 17,7$; $EC_{10} = 257,2$ mmol/L).

Um die Wirkung der Substanz auf das Längenwachstum zu beurteilen, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. In Tab. 79 sind die dabei beobachteten Effekte zusammengestellt.

Tab. 79: Zusammenstellung der Effekte von N-Methylformamid auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 Stunden

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	135,4	189,6	265,8	372,4	519,7
koaguliert ^a	120	–	–	–	4	20	20
Dotterödem	120	–	–	4	4/16	†	†
Perikardoedem	120	–	–	4	5/16	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	120	–	–	–	5/16	†	†
deformierte Schwanzspitze	120	–	–	–	4/16	†	†
Säbelschwanz	120	–	–	–	4/16	†	†
Σ teratogen		0	0	0	8/16	†	†
Σ subletal		0	0	4	14/16	†	†

Anzahl der Larven je „Konzentration“ $n = 20$. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : koagulierte und nicht geschlüpfte Embryonen zusammengefaßt

Die Anzahl der toten Embryonen veränderte sich gegenüber dem Befund nach 48 Stunden. In die Berechnung der LC_{50} gingen die Embryonen mit ein, die nicht geschlüpfen waren und sich bereits in Lyse befanden. Die LC_{50} (120 h) beträgt 294,1 mmol/L (Berechnung nach "Trimmed Spearman-Kärber") und liegt 22 % unterhalb der nach 48 Stunden ermittelten LC_{50} . Durch die Verlängerung der Testdauer ergaben sich nach Beendigung der Exposition für N-Methylformamid Hinweise auf verzögert auftretende letale Effekte.

Oedeme wurden in 189,6 mmol/L bei 20 % und in 372,4 mmol/L bei 50 % der Larven festgestellt. Da in den beiden höchsten Konzentrationen alle Embryonen abgestorben waren, wurden teratogene Effekte nur noch in der Konzentration von 265,8 mmol/L beobachtet. 50 % der Larven wiesen Deformationen des Schwanzes bzw. der Schwanzspitze auf. Bei 25 % der Larven wurde der Effekt „Säbelschwanz“ festgestellt, wobei Schwanz bzw. Körperachse nach dorsal gebogen waren. Mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode wurde nach 120 Stunden eine $EC_{50 \text{ teratogen}}$ von 265,8 mmol/L berechnet, die der mittleren geprüften Konzentration entspricht. Aufgrund der Datenlage konnte kein Vertrauensbereich angegeben werden. In Abb. 43 sind die nach 120 Stunden gemessenen Schwanzlängen der Larven dargestellt.

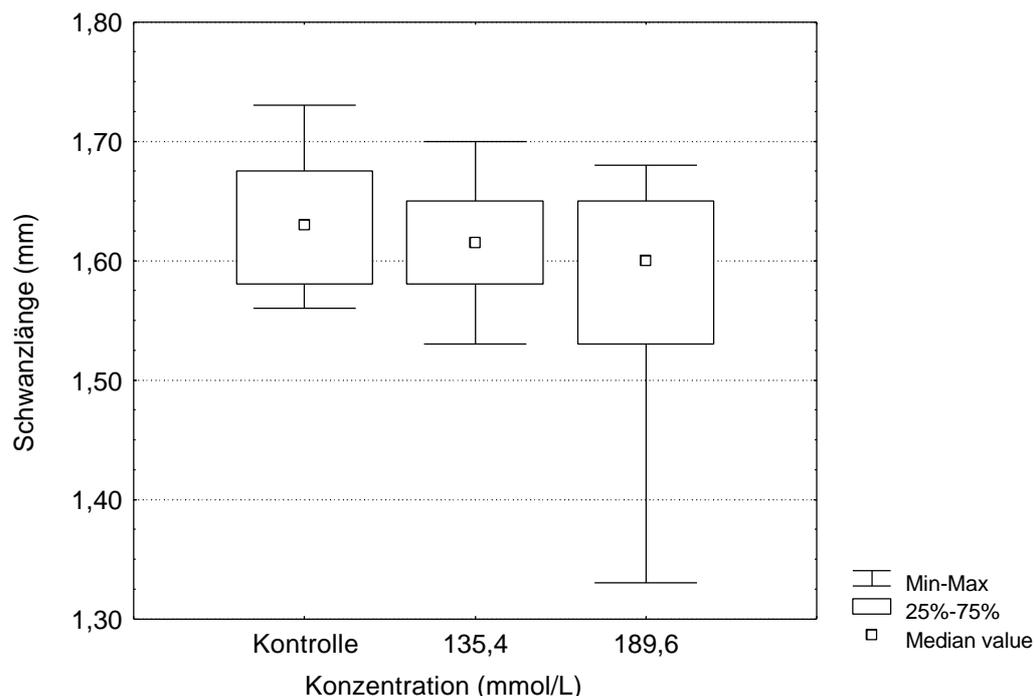


Abb. 43: Wirkung von N-Methylformamid auf die Längenentwicklung des Schwanzes

In die Auswertung der Längenentwicklung gingen nur die Larven der Kontrollen und der beiden niedrigsten Konzentrationen ein. Tendenziell nahm die Schwanzlänge mit steigender Konzentration ab. Dies zeigt sich an den Medianen, aber auch an Minimal- und Maximalwerten, die allerdings in 189,6 mmol/L weit streuen. Die Reduktion war jedoch nicht signifikant ($p = 0,05$).

In Tab. 80 sind die berechneten LC_{50} , EC_{50} und $NOEC / LOEC$ zusammengestellt. Abb. 44 veranschaulicht die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die teratogenen und die letalen Effekte.

Tab. 80: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für N-Methylformamid

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	377,8 (357,5 – 399,3)
LC_{50}	120	294,1 (276,9 – 312,4)
EC_{50} Herz-Kreislauf	48	195,0 (179,6 – 211,7)
EC_{50} Oedeme	48	160,8 (140,4 – 178,6)
EC_{50} subletal	48	160,8 (140,4 – 178,6)
EC_{50} teratogen	48	303,9 (281,7 – 327,9)
EC_{50} teratogen	120	265,8
$NOEC / LOEC$ reduzierte Schwanzlänge	120	189,6 / –
TI		1,24

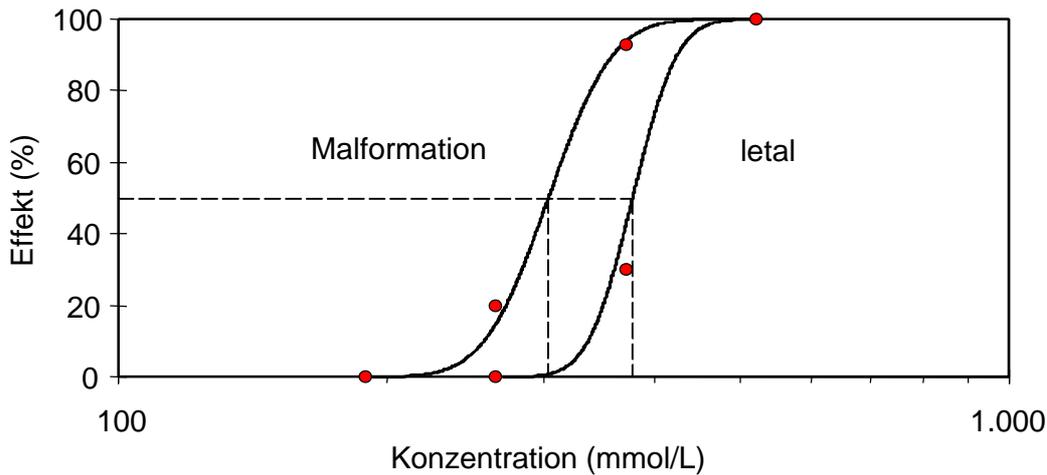


Abb. 44: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von N-Methylformamid für die teratogenen und die letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 377,8 mmol/L; $EC_{50_{\text{teratogen}}}$ (48 h): 303,9 mmol/L

Die Kurven für die letalen und die teratogenen Effekte sind deutlich voneinander getrennt. Die Sigmoide für die letalen Effekte liegt allerdings relativ eng bei der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die Malformationen. Der relativ kleine Wert für den Teratogenitätsindex TI von 1,24 verdeutlicht die Nähe von LC_{50} und EC_{50} . Da die Sigmoide für die teratogenen Effekte etwas flacher ansteigt ($b = 17,7$) als die der letalen Effekte ($b = 25,5$), nähern sich beide Kurven im oberen Bereich einander an, ohne sich jedoch zu überschneiden. Mit den Embryonen von *D. rerio* wurden für N-Methylformamid eindeutige und zum Teil starke teratogene Effekte nachgewiesen. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.15.5 (Seite 124) dargestellt.

3.15.3 Methylcarbamoylcystein

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde Methylcarbamoylcystein in den Konzentrationen 859, 1.296, 1.930, 2.912 und 4.360 $\mu\text{mol/L}$ untersucht. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 26 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da nur ein Embryo (5 %) subletale Effekte aufwies (siehe Tab. 81 und Tab. 82).

In Tab. 81 ist die Anzahl der koagulierten Embryonen aufgeführt. Die ersten koagulierten Embryonen traten nach 24 Stunden auf. Obwohl die Substanz erst relativ spät in der Embryonalentwicklung letale Effekte verursachte, ließ sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme erkennen. Die LC_{50} (48 h) beträgt 1.759 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,931$; $b = 5,9$; $LC_{10} = 1.070 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 81: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methylcarbamoylecystein

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	859	1.296	1.930	2.912	4.360
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	12	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	2	3	2	4
	36	–	–	3	3	8	20
	48	–	1	4	8	19	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 82 sind die durch Methylcarbamoylecystein verursachten subletalen Effekte zusammengestellt. Einzelne Embryonen hatten in den frühen Entwicklungsstadien Bläschen an den Blastomeren abgeschnürt. Nach zwölf Stunden war bei sieben Embryonen (35 %) in der höchsten Konzentration der Blastoporus noch nicht geschlossen. Dieser verzögerte Ablauf der Gastrulationsbewegung führte bei einem Embryo nach 24 Stunden zu einem offenen Medianspalt („Spaltembryo“) und bei vier dieser Embryonen zum unvollständigen Ablösen des Schwanzes vom Dotter. Die übrigen zwei Embryonen waren nach 24 Stunden abgestorben. Eine fehlende Spontanbewegung wurde in 2.912 $\mu\text{mol/L}$ bei drei (16,7 %) und in 4.360 $\mu\text{mol/L}$ bei 13 Embryonen (81,2 %) beobachtet. Ein Embryo (5,6 %) in 1.296 $\mu\text{mol/L}$ ließ ebenfalls keine Spontanbewegung erkennen. Betrachtet man die Schwanzablösung vom Dotter und die Entwicklung der Augen nach 24 Stunden, wird in den beiden höchsten Konzentrationen eine Entwicklungsverzögerung deutlich. Nach 36 Stunden waren in der höchsten Konzentration alle Embryonen koaguliert. In den anderen vier Konzentrationen war sowohl nach 36 als auch nach 48 Stunden eine Störung des Herz-Kreislaufsystems zu erkennen. Einen schwachen Blutkreislauf und ein Dotteroedem wies auch ein Kontrollembryo (5 %) auf. Für die EC_{50} Herz-Kreislauf (48 h) wurde ein Wert von 951 $\mu\text{mol/L}$ berechnet ($b = 7,2$; $EC_{10} = 630 \mu\text{mol/L}$). Für die in den drei niedrigen Konzentrationen aufgetretenen Oedeme besteht keine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Aufgrund der Datenlage kann für die Summe der subletalen Effekte nach 48 Stunden keine EC_{50} berechnet werden. Da in der geringsten Konzentration bereits 78,9 % der Embryonen subletale Effekte aufwiesen, liegt die EC_{50} subletal unterhalb 859 $\mu\text{mol/L}$.

Tab. 82: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methylcarbamoylcystein auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	859	1.296	1.930	2.912	4.360
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	1	–	–	–
	12	–	1	–	3	1	2
	24	–	–	–	–	–	1/16
	36	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	–	–	†
Gastrulation nicht beendet	12	–	–	1	–	–	7
keine Spontanbewegung	24	–	–	1/18	–	3/18	13/16
Somiten nicht angelegt	24	–	–	1/18	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	–	–	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	–	–	9/16
	36	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	–	–	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	2/18	7/16
	36	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	–	–	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	1/18	–
	36	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	–	–	†
schwacher Herzschlag	36	–	–	–	–	3/12	†
	48	–	2/19	2/16	1/12	1/1	†
kein Herzschlag	36	–	–	1/17	2/17	6/12	†
	48	–	–	1/16	6/12	–	†
schwacher Blutkreislauf	36	1	1	4/17	1/17	–	†
	48	1	–	1/16	1/12	–	†
kein Blutkreislauf	36	–	5	7/17	13/17	12/12	†
	48	–	8/19	12/16	11/12	1/1	†
Dotterödem	48	1	12/19	11/16	2/12	–	†
Perikardödem	48	–	3/19	3/16	2/12	–	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	1/18	–
	36	–	–	–	–	1/12	†
	48	–	–	–	–	1/1	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	–	9/16
	36	–	–	–	1/17	2/12	†
	48	–	–	1/16	3/12	1/1	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	1/17	2/12	†
	48	–	–	4/16	4/12	1/1	†
Spaltembryo	24	–	–	–	–	–	1/16
	36	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	–	–	†
Herzdeformation	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	1/12	–	†
Veränderung des Dotters	24	–	–	–	1/17	3/18	1/16
	36	–	5	5/17	2/17	3/12	†
	48	–	6/19	9/16	9/12	–	†
Σ teratogen		0	6/19	13/16	10/12	1/1	†
Σ subletal		1	15/19	16/16	12/12	1/1	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koagulierte; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Für eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems spricht ebenfalls die in einem Vorversuch ermittelte NOEC / LOEC für die Reduktion der Herzschlagfrequenz (Abb. 45). Es wurden Konzentrationen von 168 bis 859 $\mu\text{mol/L}$ getestet. Ein deutlicher Trend in der Verringerung der Herzschlaganzahl läßt sich bereits ab der geringsten Konzentration erkennen. Ab 253 $\mu\text{mol/L}$ war die Herzschlagfrequenz im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert ($p = 0,05$). In 168 und 859 $\mu\text{mol/L}$ streuen die Minimal- und Maximalwerte am weitesten.

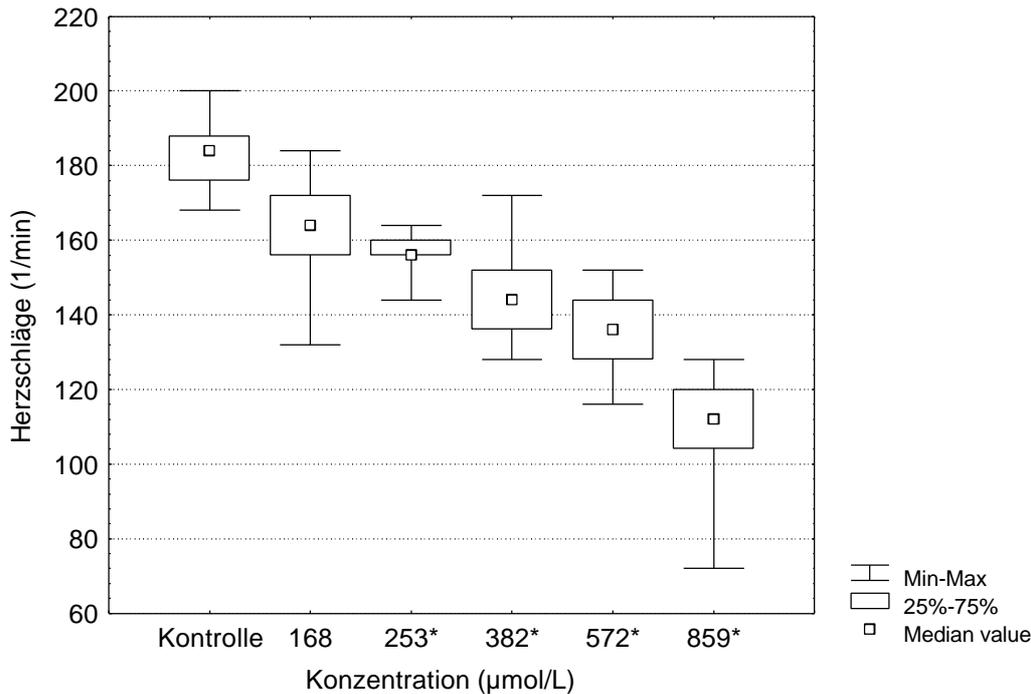


Abb. 45: Wirkung von Methylcarbamoylcystein auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz: 168 / 253 $\mu\text{mol/L}$

Teratogene Effekte traten bei Embryonen in allen Konzentrationen auf. Vor allem wurden Deformationen des Schwanzes und der Schwanzspitze verursacht. In 2.912 $\mu\text{mol/L}$ wies der einzige lebende Embryo zudem noch eine Deformation der Chorda im Schwanzbereich auf. In 1.930 $\mu\text{mol/L}$ wurde bei einem Embryo (8,3 %) ein schlauchförmig ausgebildetes Herz registriert. Eine Veränderung des Dotters (Abb. 46) trat nach 48 Stunden bei sechs Embryonen (31,6 %) in 859 $\mu\text{mol/L}$, bei neun (56,2 %) in 1.296 $\mu\text{mol/L}$ und bei neun (75 %) in 1.930 $\mu\text{mol/L}$ auf. Die drei Embryonen (25 %), die diesen Effekt nach 36 Stunden in 2.912 $\mu\text{mol/L}$ erkennen ließen, waren nach 48 Stunden koaguliert. Für die teratogenen Effekte nach 48 Stunden beträgt die EC_{50} teratogen 999 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,797$; $b = 4,1$; $EC_{10} = 489$ $\mu\text{mol/L}$).

In dem bereits oben erwähnten Vorversuch ergab sich nach 48 Stunden ein Hinweis auf die Reduktion der Schwanzlänge. Um die Wirkung von Methylcarbamoylcystein auf die Längenentwicklung einzuschätzen, wurden die Embryonen in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. In Abb. 47 sind die Schwanzlängen dargestellt.



Abb. 46: Embryo nach 48stündiger Exposition in 859 $\mu\text{mol/L}$ Methylcarbamoylcystein
Veränderung des Dotters (deformiert), Perikardoedem (60fache Vergrößerung)

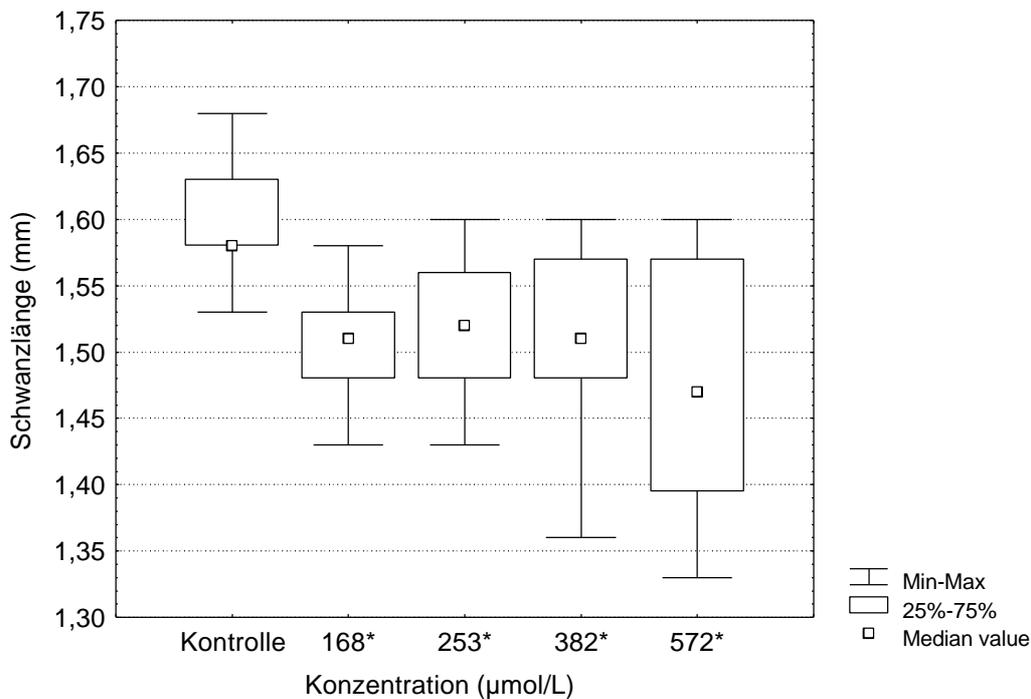


Abb. 47: Wirkung von Methylcarbamoylcystein auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge: - / 168 $\mu\text{mol/L}$

Bereits in der geringsten untersuchten Konzentration von 168 $\mu\text{mol/L}$ war die Schwanzlänge der Larven signifikant reduziert ($p = 0,05$). Der Median für 253 $\mu\text{mol/L}$ liegt etwas über denen von 168 und 382 $\mu\text{mol/L}$. Die Minimal- und Maximalwerte streuen in 382 und 572 $\mu\text{mol/L}$ weit. In 572 $\mu\text{mol/L}$ umfaßt zudem die Spanne zwischen dem ersten und dritten Quartil einen weiten Bereich.

Die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC / LOEC sind in Tab. 83 zusammengestellt. Abb. 48 veranschaulicht den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die teratogenen und letalen Effekte.

Tab. 83: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methylcarbamoylecystein

	Zeit (h)	$\mu\text{mol/L}$
LC ₅₀	48	1.759 (1.540 – 2.009)
EC ₅₀ Herz-Kreislauf	48	951 (720 – 1.112)
EC ₅₀ teratogen	48	999 (787 – 1.269)
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	168 / 253
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	– / 168
TI		1,76

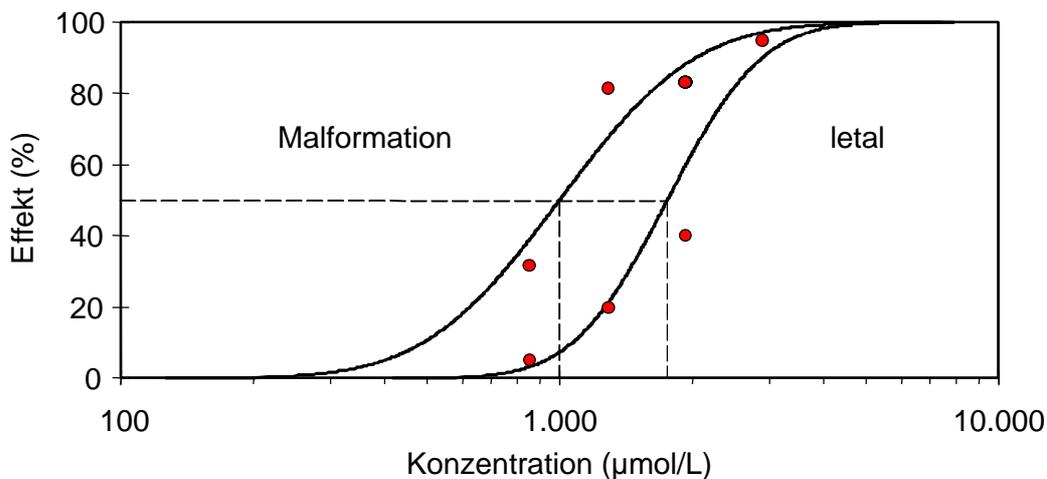


Abb. 48: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Methylcarbamoylecystein für die teratogenen und die letalen Effekte

LC₅₀ (48 h): 1.759 $\mu\text{mol/L}$; EC₅₀ teratogen (48 h): 999 $\mu\text{mol/L}$

Die Konzentrations-Wirkungskurve für die letalen Effekte ist steiler ($b = 5,9$) als die Sigmoidale für die Malformationen ($b = 4,1$). Dadurch nähern sich beide Kurven im oberen Verlauf an, überschneiden sich jedoch nicht. Die mittleren Bereiche der Sigmoiden sind deutlich voneinander getrennt. Malformationen wurden in einem Konzentrationsbereich beobachtet, in dem auch letale Effekte auftraten. Den empfindlichsten Endpunkt stellte die Reduktion der Schwanzlänge nach 120 Stunden dar. Die LOEC mit 168 $\mu\text{mol/L}$ liegt um den Faktor 5 unterhalb der geringsten Konzentration (859 $\mu\text{mol/L}$), in der 5 % letale Effekte auftraten. Methylcarbamoylecystein hat demzufolge einen stark reduzierenden Einfluß auf das Wachstum der Embryonen von *D. rerio*.

Im *DarT* zeigte Methylcarbamoylecystein ein teratogenes Potential. Der Teratogenitätsindex TI von 1,76 bekräftigt diese Einschätzung. Einschränkend muß bemerkt werden, daß trotz der deutlichen Trennung von LC₅₀ und EC₅₀ teratogen Malformationen nur in Konzentrationen beobachtet wurden, in denen auch letale Effekte auftraten.

Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.15.5 (Seite 124) dargestellt.

3.15.4 Methylcarbamoylglutathion

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde Methylcarbamoylglutathion in folgenden Konzentrationen untersucht: 412, 618, 928, 1.391 und 2.089 $\mu\text{mol/L}$. Die Sauerstoffsättigung und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. In den Konzentrationen 1.391 und 2.089 $\mu\text{mol/L}$ wurden zu Beginn des Testes pH-Werte gemessen, die kleiner als 4,5 waren, so daß pH-Wert-bedingte Effekte an den Embryonen nicht ausgeschlossen werden können (Schulte, 1997). In den drei anderen Konzentrationen und im Kontrollmedium lagen die pH-Werte in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte können der Tab. A 27 (Anhang A) entnommen werden. Der Test ist valide, da die Kontrollembryonen keine Effekte aufwiesen (siehe Tab. 84 und Tab. 85).

In Tab. 84 ist die Anzahl der koagulierten Embryonen zusammengestellt. In den beiden höchsten Konzentrationen waren nach 24 Stunden alle Embryonen abgestorben. Möglicherweise waren die Effekte durch den niedrigen pH-Wert mit bedingt. In 928 $\mu\text{mol/L}$ waren nach 24 Stunden zwölf Embryonen (63,2 %) koaguliert, alle weiteren Embryonen starben in den folgenden 24 Stunden ebenfalls ab. In dieser Konzentration kann ein Einfluß des pH-Wertes ausgeschlossen werden. In den beiden niedrigsten Konzentrationen traten keine letalen Effekte auf. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für diese Effekte verläuft sehr steil. Durch Bildung des geometrischen Mittelwertes wurde eine LC_{50} (48 h) von 757 $\mu\text{mol/L}$ berechnet.

Tab. 84: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methylcarbamoylglutathion

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	412	618	928	1.391	2.089
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	12/19	20	20
	36	–	–	–	18/19	20	20
	48	–	–	–	19/19	20	20

In 928 $\mu\text{mol/L}$ wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 85 sind die subletalen Effekte aufgeführt. In den drei niedrigen Konzentrationen zeigte sich nach 24 Stunden eine konzentrationsabhängige Störung der Spontanbewegung. Für diesen physiologischen Effekt beträgt die EC_{50} (24 h) 643 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,999$; $b = 6,7$; $\text{EC}_{10} = 413 \mu\text{mol/L}$). Bei der Ablösung des Schwanzes vom Dotter und bei der Entwicklung der Augen ließen in 928 $\mu\text{mol/L}$ alle noch lebenden Embryonen nach 24 Stunden eine Entwicklungsverzögerung erkennen. Nach 48 Stunden wurde bei 8 Embryonen (40 %) in 618 $\mu\text{mol/L}$ eine Störung von Herzschlag und Blutkreislauf beobachtet. Für eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems spricht ebenfalls die Reduktion der Herzschlagfrequenz. Wie der Abb. 49 zu entnehmen ist, war diese bereits in der niedrigsten Konzentration signifikant reduziert ($p = 0,05$). Oedeme traten bei neun Embryonen (45 %) in 618 $\mu\text{mol/L}$ auf. Mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode wurde für die Summe der subletalen Effekte eine EC_{50} (48 h) von 578 $\mu\text{mol/L}$ berechnet.

Tab. 85: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methylcarbamoylglutathion auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	412	618	928	1.391	2.089
keine Spontanbewegung	24	–	2	9	6/7	†	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	2/7	†	†
	36	–	–	–	–	†	†
	48	–	–	–	†	†	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	5/7	†	†
	36	–	–	–	–	†	†
	48	–	–	–	†	†	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	6/7	†	†
	36	–	–	–	–	†	†
	48	–	–	–	†	†	†
schwacher Herzschlag	36	–	–	–	1/1	†	†
	48	–	–	2	†	†	†
schwacher Blutkreislauf	36	–	–	5	–	†	†
	48	–	–	3	†	†	†
kein Blutkreislauf	36	–	–	4	1/1	†	†
	48	–	–	5	†	†	†
Dotteroedem	48	–	–	7	†	†	†
Perikardoedem	48	–	–	3	†	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Veränderung des Dotters	24	–	–	–	–	†	†
	36	–	–	4	–	†	†
	48	–	–	3	†	†	†
Σ teratogen		0	0	3	†	†	†
Σ subletal		0	0	12	†	†	†

In 928 $\mu\text{mol/L}$ wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

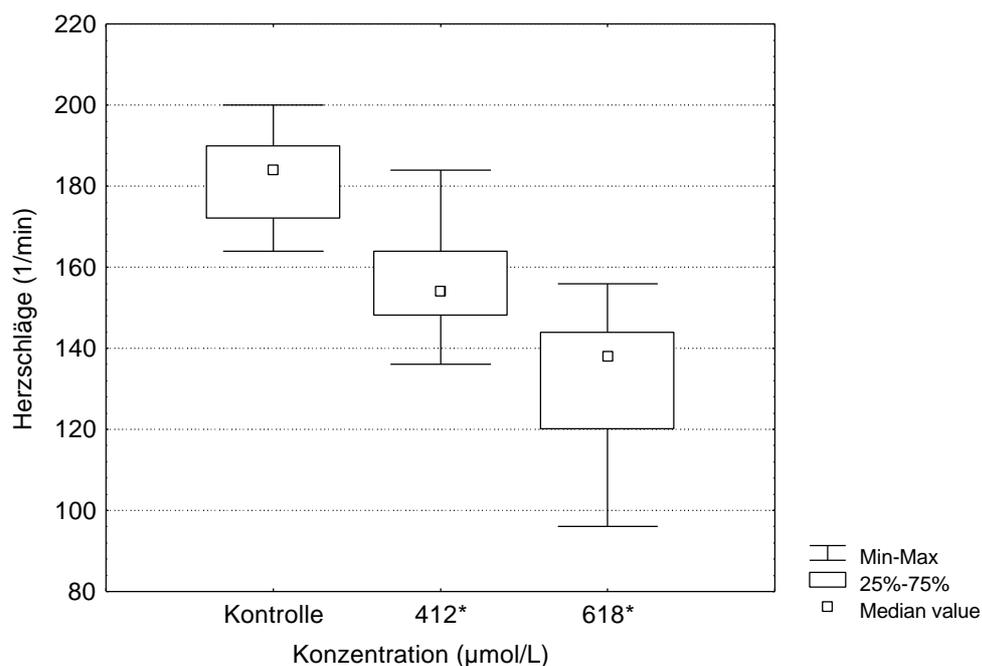


Abb. 49: Wirkung von Methylcarbamoylethion auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz: - / 412 µmol/L

Die einzigen aufgetretenen Malformationen betrafen den Dotter. In 618 µmol/L wurde dieser Effekt nach 36 bzw. 48 Stunden bei vier (20 %) bzw. bei drei Embryonen (15 %) beobachtet, eine EC_{50} konnte nicht berechnet werden. Da es nach 48 Stunden einen Hinweis auf die Reduktion der Schwanzlänge gab, wurden die Embryonen in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Die Effekte sind in Tab. 86 zusammengefaßt.

Tab. 86: Zusammenstellung der Effekte von Methylcarbamoylethion auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 Stunden

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (µmol/L)					
		Kontrolle	412	618	928	1.391	2.089
koaguliert ^a	120	-	-	2	19/19	20	20
schwacher Herzschlag	120	-	-	2/18	†	†	†
kein Herzschlag	120	-	-	1/18	†	†	†
kein Blutkreislauf	120	-	-	7/18	†	†	†
Perikardoedem	120	-	-	7/18	†	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Herzdeformation	120	-	-	3/18	†	†	†
Säbelschwanz	120	-	-	1/18	†	†	†
Veränderung des Dotters	120	-	-	7/18	†	†	†
Σ teratogen		0	0	7/18	†	†	†
Σ subletal		0	0	7/18	†	†	†

Anzahl der Larven in 928 µmol/L $n = 19$, sonst je „Konzentration“ $n = 20$. - : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koagulierte; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : koagulierte und nicht geschlüpfte Embryonen zusammengefaßt

In 618 $\mu\text{mol/L}$ waren zwei Embryonen nicht geschlüpft und koaguliert. Mittels "Spearman-Kärber" Methode wurde nach 120 Stunden eine LC_{50} von 727 $\mu\text{mol/L}$ berechnet. Dieser Wert liegt nur etwas unterhalb der LC_{50} (48 h). Durch die Verlängerung des Testzeitraumes ergab sich bei Methylcarbamoyleglutathion kein deutlicher Hinweis auf verzögert einsetzende letale Effekte.

Subletale Effekte traten nur in 618 $\mu\text{mol/L}$ bei sieben Larven (38,9 %) auf. Diese wiesen ein Perikardeodem auf, ließen keinen Blutkreislauf erkennen und hatten zum Teil keinen bzw. einen schwachen Herzschlag. Bei drei dieser Larven (16,7 %) war das Herz nur als „dünner Schlauch“ in einem „aufgeblähten“ Perikard zu erkennen. Eine Larve (5,6 %) wies einen nach dorsal gebogenen Schwanz auf („Säbelschwanz“). Bei allen sieben Larven (38,9 %) war der Dotter verändert. Weder für die teratogenen noch für die Summe der subletalen Effekte konnte eine EC_{50} berechnet werden. In Abb. 50 sind die nach 120 Stunden gemessenen Schwanzlängen dargestellt.

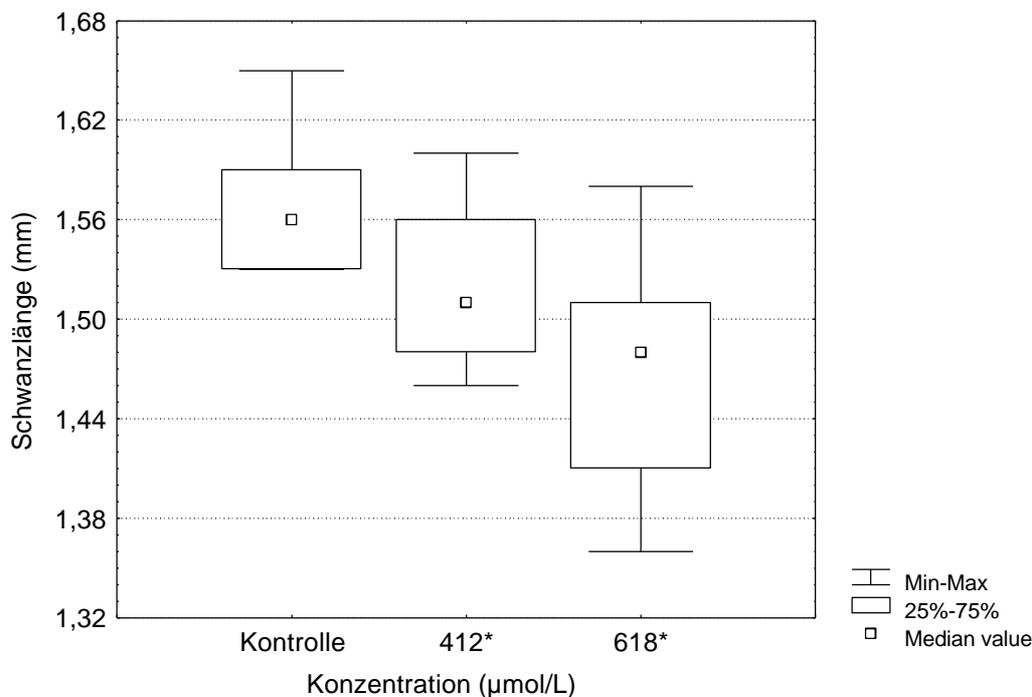


Abb. 50: Wirkung von Methylcarbamoyleglutathion auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC_{reduzierte Schwanzlänge}: – / 412 $\mu\text{mol/L}$

Obwohl nur zwei Konzentrationen in die Auswertung eingingen, wird eine konzentrationsabhängige Verkürzung der Schwanzlänge deutlich. Bereits in der geringsten Konzentration von 412 $\mu\text{mol/L}$ war die Schwanzlänge signifikant reduziert ($p = 0,05$). In 618 $\mu\text{mol/L}$ streuen die Minimal- und Maximalwerte relativ weit.

Die berechneten EC_{50} , LC_{50} und NOEC / LOEC sind in Tab. 87 zusammengefaßt.

Tab. 87: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methylcarbamoyleglutathion

	Zeit (h)	$\mu\text{mol/L}$
LC ₅₀	48	757
LC ₅₀	120	727 (689 – 768)
EC ₅₀ Spontanbewegung	24	643 (550 – 752)
EC ₅₀ subletal	48	578
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	– / 412
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	– / 412

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die von Methylcarbamoyleglutathion verursachten letalen Effekte verläuft sehr steil. Das gilt auch für die subletalen Effekte, da diese trotz einer Abstufung von Faktor 1,5 nur in einer Konzentration (618 $\mu\text{mol/L}$) auftraten. Im subletalen Konzentrationsbereich wurden nach 48 Stunden nur leichte Deformationen des Dotters festgestellt. Nach 120 Stunden wiesen einzelne Larven in 618 $\mu\text{mol/L}$ Deformationen des Herzens und des Schwanzes auf. Eine größere Anzahl von Larven (38,9 %) ließ einen deformierten Dotter erkennen. Als empfindlichster Endpunkt erwies sich die Reduktion der Schwanzlänge. Diese war bereits in 412 $\mu\text{mol/L}$ gegenüber den Kontrollen signifikant reduziert ($p = 0,05$).

Bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* wurden neben einer reduzierenden Wirkung auf das Wachstum nur einzelne Malformationen nachgewiesen. Methylcarbamoyleglutathion läßt im *DarT* kein starkes teratogenes Potential erkennen. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.15.5 dargestellt.

3.15.5 Methylformamide und Metabolite – zusammenfassende Betrachtung

N,N-Dimethylformamid verursacht im Tierversuch teratogene Effekte. Lewis (2000) gibt für die Auslösung teratogener Effekte bei der Ratte eine TCLo von 4 mg/m^3 (ihl., 4 h täglich, 1. – 19. Gestationstag) an. Mißbildungen an Rippen und der Wirbelsäule wurden bei Kaninchen (400 mg/kg , dermal), Mäusen (944 mg/kg , ipr.) und Ratten (94 mg/kg , dermal) verursacht, ohne daß maternaltoxische Effekte auftraten (Hellwig et al, 1991). Beim Kaninchen traten weiterhin Anomalien des Brustbeins und Hydrocephalus sowie das Fehlen der Gallenblase auf. Bei Mäusen wurden Gaumenspalte und Exenzephalie verursacht (BUA 84, 1992).

Lewis (2000) bezeichnet N-Methylformamid als Substanz, die im Tierversuch teratogene Effekte verursacht. Allerdings hat sie ein geringeres teratogenes Potential als N,N-Dimethylformamid. Zum Auslösen von Mißbildungen werden höhere Konzentrationen benötigt. In Untersuchungen mit Ratten verursachten 200 - 600 mg/kg (dermal, 9. Gestationstag) massiv Enzephalozele (Stula & Kraus, 1977). Gaumenspalte und Skelettmalformationen traten bei der Ratte auf, nachdem am 13. Gestationstag 500 mg/kg oral appliziert worden waren (Roll & Bär, 1967).

Klug et al. (1998) untersuchten Methylcarbamoylecystein und Methylcarbamoyleglutathion im „Mouse Limb Bud Assay“. Das Cysteinaddukt verursachte in einer Konzentration von

100 mg/L anormale Entwicklung der Gliedmaßenanlagen; 300 mg/L hemmten fast vollständig deren morphogenetische Differenzierung.

100 mg/L Methylcarbamoylglutathion führten zu leichten Retardierungen der Anlagen und 300 mg/L verursachten eine deutliche Entwicklungsstörung. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß Methylcarbamoylglutathion in geringerem Ausmaß die Entwicklung der Gliedmaßenanlagen beeinträchtigt (Klug et al., 1998). Für Methylcarbamoylglutathion (0,25 – 2 mM) wiesen Guest et al. (1992) an Mausembryonen Anzeichen von Entwicklungstoxizität, Mißbildungen der Wirbelsäule, abweichende Entwicklung der Somiten sowie embryotoxische Effekte nach. In Tab. 88 sind Daten aus säugertoxikologischen Untersuchungen zusammengestellt, wobei die Angaben in mmol/kg bzw. mmol/L umgerechnet wurden.

Tab. 88: Vergleich der geringsten wirksamen Konzentration bei Untersuchungen mit der Ratte und im „Mouse Limb Bud Assay“

	DMF (mmol/kg)	NMF (mmol/kg)	MCC (mmol/L)	MCG (mmol/L)
Ratte (dermal)	1,29	3,39		
Ratte (oral)	2,27	8,46		
„Mouse Limb Bud Assay“			0,561	0,823

DMF : N,N-Dimethylformamid; NMF : N-Methylformamid; MCC : Methylcarbamoylcystein; MCG : Methylcarbamoylglutathion

Beim Vergleich dieser aus unterschiedlichen Studien (Klug et al., 1998; Hellwig et al, 1991; Stula & Kraus, 1977; Roll & Bär, 1967) zusammengestellten Daten wird deutlich, daß N,N-Dimethylformamid bei der Ratte ab bedeutend geringeren Dosen teratogene Effekte auslöst als N-Methylformamid. Im „Mouse Limb Bud Assay“ beeinträchtigt Methylcarbamoylcystein die Entwicklung der Gliedmaßenanlagen stärker als Methylcarbamoylglutathion.

In Tab. 89 sind die im *DarT* verursachten teratogenen Effekte zusammengestellt (phänomenologisch).

Tab. 89: Phänomenologische Zusammenfassung der im *DarT* beobachteten teratogenen Effekte

Effekt	DMF	NMF	MCC	MCG
Chordadeformation	●	●	●	
Schwanzdeformation	●	●	●	● ^b
Schwanzspitze	●	●	●	● ^b
Kopfdeformation	●	● ^a		
Spaltembryo	●	●		
Herzdeformation			●	● ^b
Sacculi nicht angelegt	●	●		
Dotterdeformation			●	●
reduzierte Schwanzlänge			●	●

DMF : N,N-Dimethylformamid; NMF : N-Methylformamid; MCC : Methylcarbamoylecystein; MCG : Methylcarbamoyleglutathion; a : Effekt nach 24 h aufgetreten; b : Effekt nach 120 h aufgetreten

Im *DarT* verursachten sowohl N,N-Dimethylformamid als auch N-Methylformamid Deformationen der Chorda, des Schwanzes und des Kopfes sowie Spaltembryonen und fehlende Sacculi. Bei N-Methylformamid exponierten Embryonen wurde die Kopfdeformation nur nach 24 Stunden beobachtet, da die Embryonen danach abgestorben waren. Methylcarbamoylecystein verursachte ebenso Deformationen der Chorda und des Schwanzes. Letztere wurden auch bei Methylcarbamoyleglutathion beobachtet, allerdings erst nach 120 Stunden an den geschlüpften Larven. Dotter- und Herzdeformationen wurden nur von Methylcarbamoylecystein und Methylcarbamoyleglutathion verursacht, wobei die Herzdeformation bei Methylcarbamoyleglutathion wiederum erst an den Larven auftrat. Eine Reduzierung des Längenwachstums wurde ebenfalls nur für Methylcarbamoylecystein und Methylcarbamoyleglutathion nachgewiesen. Spaltembryonen und fehlende Sacculi traten nur bei in N,N-Dimethylformamid und N-Methylformamid exponierten Embryonen auf. In Tab. 90 sind die im *DarT* berechneten Wirkkonzentrationen zusammengestellt.

Tab. 90: Zusammenstellung von EC₅₀ teratogen (48 h) und LOEC_{reduzierte Schwanzlänge} (120 h)

	EC ₅₀ teratogen (mmol/L)	LOEC _{reduzierte Schwanzlänge} (µmol/L)
N,N-Dimethylformamid	93,8	–
N-Methylformamid	303,9	–
Methylcarbamoylecystein	1,0 ^a	168
Methylcarbamoyleglutathion	–	412

– : nicht berechnet, a : Wert gerundet

Der Vergleich der im *DarT* berechneten EC₅₀ teratogen zeigt, daß N,N-Dimethylformamid vergleichbare teratogene Effekte in Konzentrationen verursacht, die um den Faktor 3 unter denen von N-Methylformamid liegen.

Methylcarbamoylecystein zeigt ein bedeutend höheres teratogenes Potential. Für diese Substanz ist die EC₅₀ teratogen nochmals um einen Faktor von etwa 90 kleiner als die von N,N-

Dimethylformamid. Für Methylcarbamoylglutathion konnte keine $EC_{50 \text{ teratogen}}$ berechnet werden. Da aber sowohl bei dieser Substanz als auch bei Methylcarbamoylcystein eine Reduktion der Schwanzlänge beobachtet wurde, bietet sich ein Vergleich der für diesen Endpunkt berechneten LOECs an. Für Methylcarbamoylcystein liegt diese etwa um den Faktor 2,5 unter der von Methylcarbamoylglutathion.

Das aus Untersuchungen mit Säugetieren bekannte Verhältnis im teratogenen Potential der Substanzen wird gut wiedergegeben. N,N-Dimethylformamid zeigt sowohl bei Untersuchungen mit Ratten als auch im *DarT* ein höheres teratogenes Potential als N-Methylformamid. Die im *DarT* ermittelte $EC_{50 \text{ teratogen}}$ für Methylcarbamoylcystein liegt noch um Größenordnungen unter der für die beiden erst genannten Substanzen. Ein Vergleich mit der Wirkung von Methylcarbamoylglutathion ist über die $LOEC_{\text{reduzierte Schwanzlänge}}$ möglich. Auch hier wirkt Methylcarbamoylcystein in niedrigeren Konzentrationen als das Glutathionaddukt. Dies entspricht den Ergebnissen aus Untersuchungen mit dem „Mouse Limb Bud Assay“. Beim Säuger wirken die Substanzen nach metabolischer Aktivierung teratogen. Da im Embryotest eindeutige und zum Teil sehr starke teratogene Effekte (Spaltembryonen, Kopfmißbildungen) nachgewiesen wurden, läßt sich schlußfolgern, daß die Embryonen von *Danio rerio* in der Lage sind, diese Substanz in einem gewissen Grad zu metabolisieren. Untersuchungen von Groth et al. (1994) bestätigen diese Befunde.

3.16 Methylquecksilberchlorid

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurde Methylquecksilberchlorid in folgenden Konzentrationen untersucht: 0,139; 0,239; 0,438; 0,757 und 1,195 $\mu\text{mol/L}$. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 29 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da nur ein Kontrollembryo (5,6 %) Effekte aufwies (siehe Tab. 91 und Tab. 92).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 91 aufgeführt. Nach 24 Stunden waren in den beiden höchsten Konzentrationen bereits alle Embryonen koaguliert. Bis zum Ende des Testes starben keine weiteren Embryonen ab. Für die letalen Effekte besteht eine steile Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Durch Bildung des geometrischen Mittelwertes wurde eine LC_{50} (48 h) von 0,576 $\mu\text{mol/L}$ errechnet.

Tab. 91: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methylquecksilberchlorid

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	0,139	0,239	0,438	0,757	1,195
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	1
	24	–	–	–	–	20	20
	36	–	–	–	–	20	20
	48	–	–	–	–	20	20

In der Kontrolle wurden 18 Embryonen eingesetzt, in 0,139 $\mu\text{mol/L}$ und 0,438 $\mu\text{mol/L}$ 19; sonst je 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 92 sind die von Methylquecksilberchlorid verursachten subletalen Effekte zusammengestellt. Nach acht Stunden wurden bei einem Embryo (5,3 %) in 0,438 $\mu\text{mol/L}$, bei elf (55 %) in 0,757 $\mu\text{mol/L}$ und bei 16 Embryonen (84,2 %) in 1,195 $\mu\text{mol/L}$ Bläschen an den Blastomeren festgestellt. Vermutlich verursachte die starke allgemeine Toxizität von Methylquecksilberchlorid diese frühen Effekte, da osmotische Effekte nicht zu erwarten waren (siehe oben). Dafür spricht ebenfalls, daß sechs Embryonen (31,6 %) in 1,195 $\mu\text{mol/L}$ bereits nach acht Stunden ihre Entwicklung einstellten und keine Epibolie durchführten, und daß diese in den folgenden 16 Stunden abstarben. Für die frühen Störungen der Ontogenese beträgt die EC_{50} (8 h) 0,755 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,995$; $b = 6,6$; $EC_{10} = 0,483 \mu\text{mol/L}$). Drei Embryonen (15,8 %) in 0,438 $\mu\text{mol/L}$ hatten nach 24 Stunden den Schwanz noch nicht vollständig vom Dotter abgelöst, und zehn Embryonen (52,6 %) ließen keine Spontanbewegung erkennen. Eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems (schwacher bzw. kein Blutkreislauf nach 36 und 48 Stunden) wurde vor allem in 0,438 $\mu\text{mol/L}$ festgestellt. In Abb. 51 ist die Herzschlagfrequenz nach 48 Stunden dargestellt.

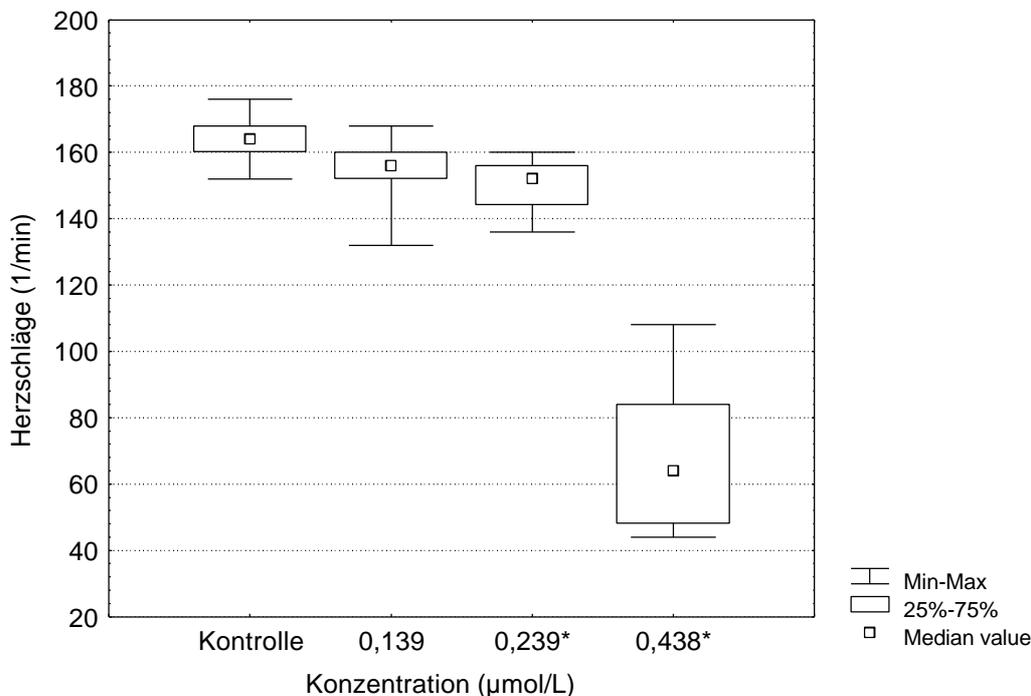


Abb. 51: Wirkung von Methylquecksilberchlorid auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC_{reduzierte Herzschlagfrequenz}: 0,139 / 0,239 $\mu\text{mol/L}$

Eine Verringerung der Herzschlagfrequenz zeigte sich bereits in der geringsten Konzentration, ab 0,239 $\mu\text{mol/L}$ war sie gegenüber den Kontrollen signifikant reduziert ($p = 0,05$). Eine starke Reduktion zeigte sich in der Konzentration von 0,438 $\mu\text{mol/L}$, in der noch keine letalen Effekte auftraten. Diese massive Verringerung der Herzschlagfrequenz ist durch die starke allgemeine Schädigung der Embryonen in 0,438 $\mu\text{mol/L}$ bedingt.

Nach 48 Stunden traten vermehrt Oedeme auf, wobei bei einem Kontrollembryo ein Perikardoedem festgestellt wurde. Die mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode

berechnete $EC_{50 \text{ Oedeme}}$ beträgt $0,32 \mu\text{mol/L}$. In $0,438 \mu\text{mol/L}$ waren fünf Embryonen (26,3 %) nicht pigmentiert. Für die Summe der subletalen Effekte nach 48 Stunden berechnet sich eine $EC_{50 \text{ subletal}}$ von $0,149 \mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,982$; $b = 7,6$; $EC_{10} = 0,101 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 92: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methylquecksilberchlorid auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	0,139	0,239	0,438	0,757	1,195
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	1/19	11	16/19
keine Gastrulation	8	–	–	–	–	–	6/19
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	10/19	†	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	3/19	†	†
	36	–	–	–	–	†	†
	48	–	–	–	–	†	†
kein Herzschlag	36	–	–	1	–	†	†
	48	–	–	–	–	†	†
schwacher Blutkreislauf	36	–	1/19	1	3/19	†	†
	48	–	–	1	–	†	†
kein Blutkreislauf	36	–	–	1	12/19	†	†
	48	–	–	1	19/19	†	†
keine Pigmentierung	48	–	–	–	5/19	†	†
Dotterödem	48	–	1/19	1	13/19	†	†
Perikardoedem	48	1/18	1/19	1	9/19	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	7	9/19	†	†
	36	–	1/19	9	10/19	†	†
	48	–	3/19	13	10/19	†	†
Chordadeformation (Körper)	24	–	–	5	8/19	†	†
	36	–	2/19	5	8/19	†	†
	48	–	6/19	8	8/19	†	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	18/19	†	†
deformierte Sacculi	48	–	–	–	1/19	†	†
deformiertes Dotter ^a	48	–	–	–	1/19	†	†
Rundrücken ^a	48	–	–	1	–	†	†
Säbelschwanz ^a	48	–	–	2	–	†	†
Σ teratogen (ohne ^a)		0	9/19	17	18/19	†	†
Σ subletal		1/18	9/19	18	19/19	†	†

In der Kontrolle wurden 18 Embryonen eingesetzt, in $0,139 \mu\text{mol/L}$ und $0,438 \mu\text{mol/L}$ 19; sonst je 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koagulierte; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : am entchorionierten Embryo beobachtet

In den beiden höchsten Konzentrationen waren nach 48 Stunden alle Embryonen koaguliert. In den drei übrigen Konzentrationen wurden bei einer Vielzahl der Embryonen Deformationen der Chorda verursacht. In 0,139 $\mu\text{mol/L}$ waren neun Embryonen (47,4 %), in 0,239 $\mu\text{mol/L}$ 17 Embryonen (85 %) und in 0,438 $\mu\text{mol/L}$ elf Embryonen (57,9 %) betroffen. Zum Teil war bei den Embryonen die Chorda sowohl im Schwanzbereich als auch im Bereich des Körpers deformiert. In 0,438 $\mu\text{mol/L}$ wiesen 18 Embryonen (94,7 %) eine stark deformierte Schwanzspitze und einer (5,3 %) eine Deformation der Sacculi auf.

Um die Wirkung von Methylquecksilberchlorid auf das Längenwachstum zu beurteilen, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Testmedium überführt und mechanisch entchorioniert. Diese Präparation ist zeitaufwendig und birgt Gefahr, daß Embryonen beschädigt werden. Aufgrund dieser Befunde wurde in allen folgenden Testen die Schwanzlänge nach dem natürlichen Schlupf gemessen (siehe 2.4.8, Seite 15).

Bei vier Embryonen wurden nach dem Entfernen des Chorions zusätzlich Effekte beobachtet, die vorher nicht festgestellt werden konnten. Einer der freipräparierten Embryonen (5,3 %) aus 0,438 $\mu\text{mol/L}$ hatte einen deformierten Dotter. Bei zwei Embryonen (10 %) aus 0,239 $\mu\text{mol/L}$ war der Schwanz nach dorsal gebogen („Säbelschwanz“) und bei einem weiteren (5 %) war die gesamte Körperachse nach ventral gekrümmt („Rundrücken“). Um die Vergleichbarkeit der Daten aller Untersuchungen zu gewährleisten gingen diese Befunde nicht in die Berechnung der $EC_{50 \text{ teratogen}}$ ein. Die $EC_{50 \text{ teratogen}}$ (48 h) beträgt 0,135 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,957$; $b = 3,4$; $EC_{10} = 0,056 \mu\text{mol/L}$).

Die ermittelten Schwanzlängen der Embryonen sind in Abb. 52 dargestellt.

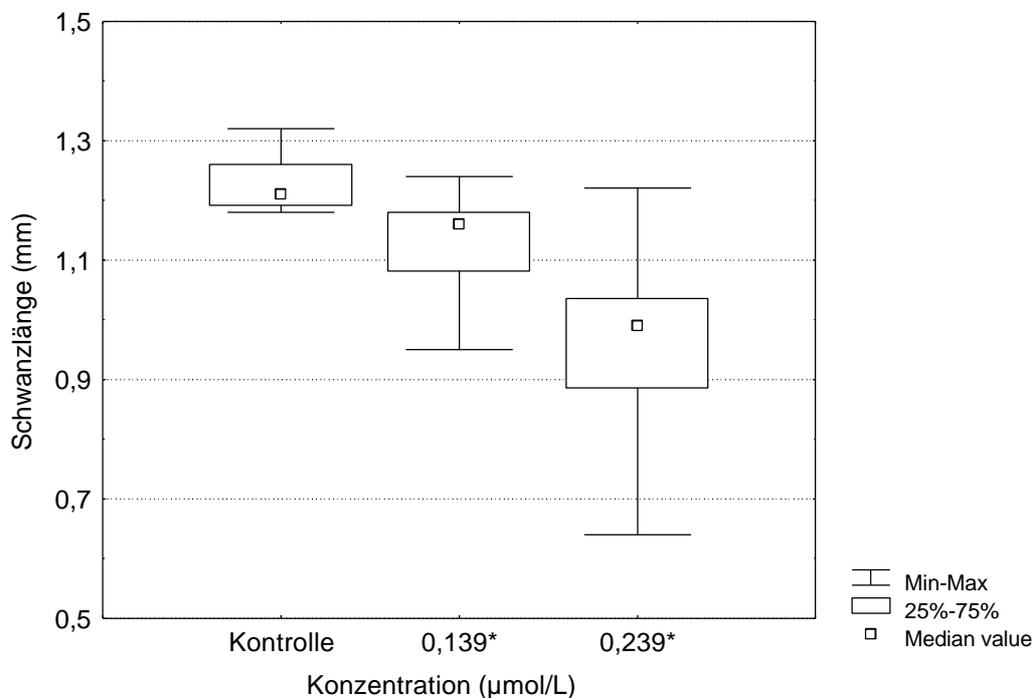


Abb. 52: Wirkung von Methylquecksilberchlorid auf die Längenentwicklung des Schwanzes nach 48 Stunden

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC_{reduzierte Schwanzlänge}: – / 0,139 $\mu\text{mol/L}$

Obwohl neben der Kontrolle nur zwei Konzentrationen ausgewertet werden konnten, wird die konzentrationsabhängige Reduktion der Schwanzlänge deutlich. Die Mediane beider Konzentrationen liegen unterhalb des Medians der Kontrollen. Die Minimal- und Maximalwerte in $0,239 \mu\text{mol/L}$ streuen relativ weit. Ab $0,139 \mu\text{mol/L}$ war die Schwanzlänge der Embryonen signifikant reduziert ($p = 0,05$). Beim Vergleich mit anderen Substanzen ist zu beachten, daß bei diesem Test die Schwanzlänge bereits nach 48 Stunden gemessen wurde und nicht wie in den übrigen Untersuchungen nach dem natürlichen Schlupf (120 h).

In Tab. 93 sind die berechneten EC_{50} , LC_{50} und NOEC / LOEC zusammengestellt. Abb. 53 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die letalen und die teratogenen Effekte.

Tab. 93: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methylquecksilberchlorid

	Zeit (h)	$\mu\text{mol/L}$
LC_{50}	48	0,576
EC_{50} Ontogenese	8	0,755 (0,656 – 0,869)
EC_{50} Oedeme	48	0,32 (0,31 – 0,34)
EC_{50} subletal	48	0,149 (0,127 – 0,173)
EC_{50} teratogen	48	0,135 (0,093 – 0,196)
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	0,139 / 0,239
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	48	– / 0,139
TI		4,27

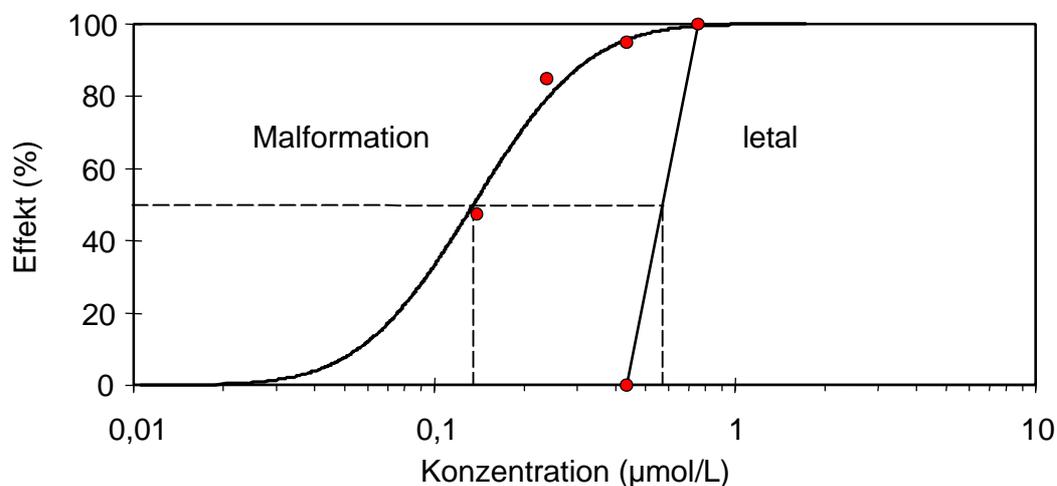


Abb. 53: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Methylquecksilberchlorid für die teratogenen und letalen Effekte

LC_{50} (48 h): $0,576 \mu\text{mol/L}$; EC_{50} teratogen (48 h): $0,135 \mu\text{mol/L}$

Die Sigmoide für die teratogenen Effekte und die Gerade der letalen Effekte sind deutlich voneinander getrennt. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die letalen Effekte verläuft sehr steil, während sich die Sigmoide für die teratogenen Effekte über nahezu zwei Größenordnungen erstreckt. Malformationen und die Reduktion der Schwanzlänge wurden im eindeutig nicht letalen Konzentrationsbereich verursacht. Im *DarT* zeigte sich für Methyl-

quecksilberchlorid ein teratogenes Potential. Der Teratogenitätsindex TI von 4,27 bestärkt diese Aussage.

Methylquecksilberchlorid verursacht sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch teratogene Effekte. Smith et al. (1983) ordnen es als stark positives Teratogen bei Maus und Ratte ein. Danach verursacht eine oral verabreichte Dosis von 30 bzw. 35 mg/kg Malformationen und Wachstumsretardierungen. Harris et al. (1972) applizierten Hamstern täglich 2 mg/kg (ipr., Gestationstag 1 – 14). Als Effekte traten die Erhöhung der maternalen Letalität und der Resorptionsrate sowie Malformationen an den lebenden Feten auf. 8 mg/kg (ipr., am 5., 8. oder 9. Gestationstag) verursachten eine starke Resorption der Feten sowie eine hohe Malformationsrate an den lebenden Neugeborenen. Als Mißbildungen traten vor allem Effekte der Füße („Klumpfuß“) und Hydrozephalus auf. Lewis (2000) gibt als geringste teratogen wirksame Dosis TDLo bei der Maus 10 mg/kg an (oral, Gestationstag 12), ohne näher auf die Effekte einzugehen.

Der Verzehr von Methylquecksilber kontaminiertem Fisch führte in Japan zu Symptomen, die als „Minamata-Krankheit“ beschrieben wurden. Aufgrund der guten Fettlöslichkeit von organischen Quecksilberverbindungen wurden vor allem schwere Nervenschädigungen (ZNS) verursacht. Bei Neugeborenen, die einer fetalen Exposition ausgesetzt waren, kam es in geringem Maß zu abnormer Zahnentwicklung und zum Auftreten von Mikrozephalie (28 %). Im Gegensatz dazu wurden massiv neurologische Veränderungen induziert, wie spastische Zerebralparese und Verhaltensänderungen. Das fetale Gehirn mit seiner nahezu vollständig entwickelten Architektur ist besonders empfindlich gegenüber Alkylquecksilberverbindungen (Shepard, 1992; Marquardt & Schäfer, 1994).

3.17 Penicillin G-Natriumsalz

Nach einem Vorversuch wurden folgende Konzentrationen untersucht: 5,5; 8,3; 12,5; 18,7 und 28,0 mmol/L. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität lagen sowohl im Kontrollmedium als auch in den Testlösungen in dem für den Test zulässigen Bereich. Nach Beendigung des Testes waren die pH-Werte in allen Konzentrationen stark gesunken. Die Werte sind in Tab. A 30 (Anhang A) zusammengestellt. Penicillin G wird unter anderem zu Penicillinsäure metabolisiert (HSDB, 2001). Eine Anreicherung von Metaboliten im Testmedium könnte das Absinken des pH-Wertes verursacht haben. Inwieweit die Embryonen in der Lage sind die Substanz zu metabolisieren, wurde nicht untersucht. In den vier höchsten Konzentrationen sank der pH-Wert unter 4,5. Da in 8,3 und 12,5 mmol/L nur ein bzw. zwei Embryonen koaguliert waren, in 18,7 und 28,0 mmol/L jedoch 18 bzw. alle Embryonen, wird davon ausgegangen, daß die Effekte nicht durch den niedrigen pH-Wert verursacht wurden.

Der Test ist valide, da bei den Kontrollen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 94 und Tab. 95). Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 94 zusammengestellt. Erst nach 24 Stunden wurden letale Effekte festgestellt. Nach 48 Stunden beträgt die LC_{50} 15,3 mmol/L ($R^2 = 0,999$; $b = 14,2$; $LC_{10} = 12,4$ mmol/L).

Tab. 94: Zusammenstellung der letalen Effekte von Penicillin G-Natriumsalz

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	5,5	8,3	12,5	18,7	28,0
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	1	2	14	20
	48	–	–	1	2	18	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 95 sind die durch Penicillin G-Natriumsalz verursachten subletalen Effekte zusammengestellt. In der zweithöchsten Konzentration zeigten nach 24 Stunden fünf der sechs lebenden Embryonen (83,3 %) eine deutliche Entwicklungsverzögerung beim Ablösen des Schwanzes. Vier dieser Embryonen koagulierten innerhalb der nächsten 24 Stunden. In den drei niedrigsten Konzentrationen hatten 11,1 % bis 15,8 % der Embryonen Dotterödeme. Eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung war nicht zu erkennen. Die EC_{50} für die subletalen Effekte nach 48 Stunden beträgt 13,2 mmol/L (Berechnung nach "Trimmed Spearman-Kärber"). Wie in Abb. 54 zu erkennen ist, wurde durch Penicillin G-Natriumsalz bei den überlebenden Embryonen bis 12,5 mmol/L die Herzschlagfrequenz nicht signifikant verändert ($p = 0,05$).

Tab. 95: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Penicillin G-Natriumsalz auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	5,5	8,3	12,5	18,7	28,0
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	1/18	2/6	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	–	3/6	†
	48	–	–	–	–	–	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	2/6	†
	48	–	–	–	–	–	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	2/6	†
	48	–	–	–	–	–	†
schwacher bzw. unvollständiger Blutkreislauf	48	–	–	1/19	–	1/2	†
starkes Zucken	48	–	–	–	3/18	–	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	–	2/2	†
Dotterödem	48	–	3	3/19	2/18	–	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Körper)	24	–	–	–	–	1/6	†
	48	–	–	–	–	–	†
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	2/6	†
	48	–	–	–	–	–	†
keine Kopfanlage	24	–	–	–	–	2/6	†
	48	–	–	–	–	–	†
Σ teratogen		0	0	0	0	0	†
Σ subletal		0	3	3/19	6/18	2/2	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

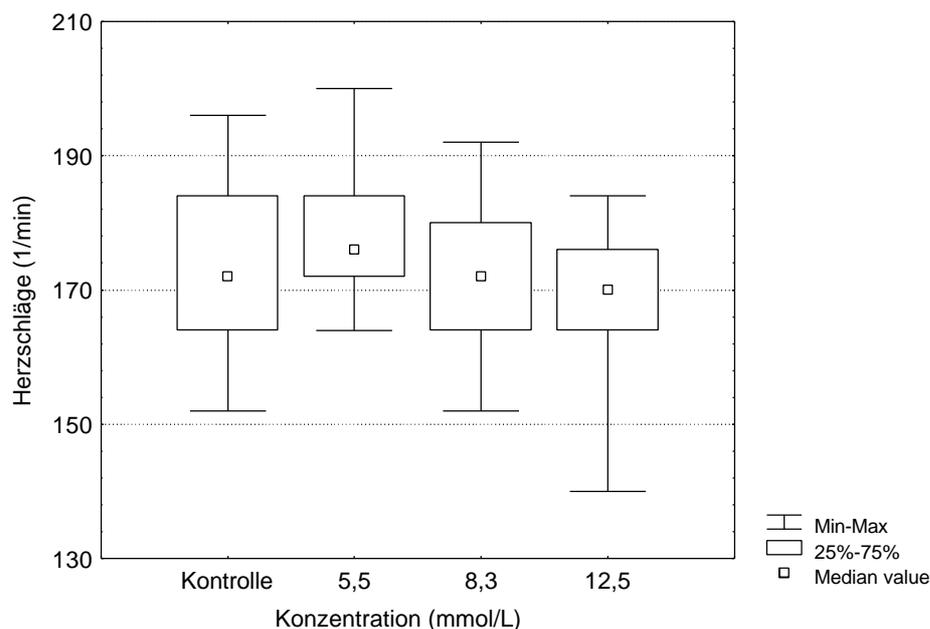


Abb. 54: Wirkung von Penicillin G-Natriumsalz auf die Herzschlagfrequenz

In der zweithöchsten Konzentration zeigten nach 24 Stunden drei von den sechs lebenden Embryonen Malformationen der Chorda und des Schwanzes bzw. hatten keinen Kopf angelegt. Innerhalb der folgenden 24 Stunden starben diese Embryonen. Nach 48 Stunden konnten keine weiteren teratogenen Effekte beobachtet werden. Es gab keinen Hinweis auf eine Reduktion der Schwanzlänge. In Tab. 96 sind die berechneten LC₅₀ und EC₅₀ zusammengestellt.

Tab. 96: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Penicillin G-Natriumsalz

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	15,3 (14,1 – 16,6)
EC _{50 subletal}	48	13,2 (11,2 – 15,6)

In der zweithöchsten untersuchten Konzentration waren nach 24 Stunden bereits 70 % der Embryonen koaguliert. In diesem letalen Konzentrationsbereich wiesen drei der noch lebenden Embryonen (50 %) Mißbildungen auf, bevor auch sie in den folgenden 24 Stunden abstarben. Bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* wurden Malformationen durch die letale Wirkung der Substanz überdeckt. Im *DarT* ergab sich kein Hinweis auf ein teratogenes Potential von Penicillin G-Natriumsalz.

Aus der Literatur sind keine durch Penicillin G-Natriumsalz beim Säuger verursachten teratogenen Effekte bekannt. Weder bei der Maus noch beim Kaninchen ergaben sich Hinweise auf ein teratogenes Potential von Penicillin (Shepard, 1992). Courtney & Valerio (1968) fanden keine durch Penicillin G verursachten teratogenen Effekte bei *Macaca mulatta*. Shepard (1992) führt vielfältige Studien an, bei denen die Frauen während der Schwangerschaft mit Penicillin behandelt worden waren. Es wurden keine Effekte an den Neugeborenen festgestellt.

3.18 2-Propanol

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurde 2-Propanol in folgenden Konzentrationen untersucht: 52,1; 72,5; 101,8; 142,6 und 199,5 mmol/L. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Für die Osmolarität wurden in den drei höchsten Konzentrationen Werte über 100 mOsmol/L gemessen, so daß osmotische Effekte nicht ausgeschlossen werden können. Die Meßwerte sind der Tab. A 31 (Anhang A) zu entnehmen. Der Test ist valide, da nicht mehr als 5 % der Kontrollembryonen Effekte aufwiesen (siehe Tab. 97 und Tab. 98).

Die letalen Effekte sind in Tab. 97 zusammengestellt. In der Kontrolle war nach 36 Stunden ein Embryo koaguliert. Bei den exponierten Embryonen traten ab 24 Stunden in 199,5 mmol/L letale Effekte auf. Bis zum Meßzeitpunkt nach 48 Stunden koagulierten alle Embryonen in dieser Konzentration. Da die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung sehr steil

verläuft, wurde durch geometrische Mittelwertbildung eine LC_{50} (48 h) von 168,7 mmol/L errechnet.

Tab. 97: Zusammenstellung der letalen Effekte von 2-Propanol

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	52,1	72,5	101,8	142,6	199,5
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	–	5
	36	1	–	–	–	–	15
	48	1	–	–	–	–	20

In 142,6 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die subletalen Effekte sind in Tab. 98 aufgeführt. 2-Propanol bewirkt eine starke Störung der frühen Embryonalentwicklung. Vor allem in den beiden höchsten Konzentrationen entwickelten zahlreiche Embryonen bis 2,5 Stunden nach Testbeginn keine hohe Blastula. Nach acht Stunden waren die Vorgänge während der Epibolie stark verzögert. Für die Verzögerung der frühen Embryonalentwicklung beträgt die EC_{50} (8 h) 85,5 mmol/L ($R^2 = 0,993$; $b = 16,6$; $EC_{10} = 71,5$ mmol/L). In der höchsten Konzentration manifestierten sich diese Effekte nach 24 Stunden bei sieben Embryonen (46,7 %) in einem Entwicklungsstop noch vor dem Schließen des Blastoporus. Die übrigen noch lebenden Embryonen dieser Konzentration hatten keine Somiten angelegt, ließen weder Kopf- noch Augenanlage erkennen und koagulierten bis zum Meßzeitpunkt nach 48 Stunden.

Obwohl in den drei höchsten Konzentrationen Werte von über 100 mOsmol/L bestimmt worden waren, ließen sich keine wie von Lange et al. (1995) beschriebenen, osmotischen Effekte beobachten.

Betrachtet man nach 24 Stunden die Schwanzablösung vom Dotter bzw. den Entwicklungsstand der Augen, wird auch bei vier Embryonen (20 %) in 101,8 mmol/L und bei zwölf Embryonen (63,2 %) in 142,6 mmol/L eine Verzögerung der Embryonalentwicklung deutlich. Als EC_{50} Entwicklungsverzögerung (24 h) errechnet sich ein Wert von 129,5 mmol/L ($b = 9,2$; $EC_{10} = 93,9$ mmol/L). Herzschlag und Blutkreislauf waren sowohl nach 36 als auch nach 48 Stunden beeinträchtigt. Oedeme wurden nach 48 Stunden in allen Konzentrationen vermehrt festgestellt. Die EC_{50} Herz-Kreislauf (48 h) beträgt 82,3 mmol/L ($b = 11,5$; $EC_{10} = 63,6$ mmol/L). Auf eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems weist auch die Reduktion der Herzschlagfrequenz hin (Abb. 55). Bereits ab 72,5 mmol/L läßt sich eine Verringerung der Herzschläge pro Minute erkennen. Eine signifikante Reduktion ($p = 0,05$) wurde ab 101,8 mmol/L nachgewiesen. Allerdings streuen die Minimal- und Maximalwerte in 101,8 und 142,6 mmol/L am weitesten. In 142,6 mmol/L war bei sechs Embryonen (31,6 %) die Pigmentierung gegenüber den Kontrollen stark reduziert. Für die Summe der subletalen Effekte nach 48 Stunden beträgt die EC_{50} subletal 85,3 mmol/L ($R^2 = 0,999$; $b = 16,9$; $EC_{10} = 71,6$ mmol/L).

Tab. 98: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 2-Propanol auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	52,1	72,5	101,8	142,6	199,5
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	1	11/19	18
verzögerte Gastrulation	8	–	–	4	17	19/19	20
Gastrulation nicht beendet	24	1	–	–	–	–	7/15
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	–	4/19	8/15
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	–	–	7/15
	36	–	–	–	–	–	3/5
	48	–	–	–	–	–	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	2	12/19	–
	36	–	–	–	2	12/19	–
	48	–	–	–	–	–	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	–	7/15
	36	–	–	–	–	–	4/5
	48	–	–	–	–	–	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	3	7/19	1/15
	36	–	–	–	3	7/19	–
	48	–	–	–	–	–	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	–	7/15
	36	–	–	–	–	–	4/5
	48	–	–	–	–	–	†
schwacher Herzschlag	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	3	1/19	†
kein Herzschlag	36	–	–	–	3	10/19	5/5
	48	–	–	–	–	7/19	†
schwacher bzw. unvollständiger Blutkreislauf	36	–	1	–	–	–	–
	48	–	–	–	1	–	†
kein Blutkreislauf	36	–	–	11	20	19/19	5/5
	48	–	–	2	9	16/16	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	–	6/19	†
Dotteroedem	48	–	–	2	13	19/19	†
Perikardoedem	48	–	1	1	14	13/19	†

Fortsetzung Tab. 98

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	52,1	72,5	101,8	142,6	199,5
<i>Malformationen:</i>	24	–	–	–	–	1/19	–
Chordadeformation (Schwanz)	36	–	–	–	–	1/19	–
	48	–	–	–	–	2/19	†
keine Kopf- und Schwanzanlage	24	–	–	–	–	–	4/15
	36	–	–	–	–	–	1/5
	48	–	–	–	–	–	†
Kopfdeformation	24	–	–	–	–	–	3/15
	36	–	–	–	–	–	2/5
	48	–	–	–	–	–	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	4/19	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	1/19	†
Spaltembryo	24	–	–	–	–	–	4/15
	36	–	–	–	–	–	3/5
	48	–	–	–	–	–	†
Herzdeformation	36	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	4/19	†
Σ teratogen		0	0	0	0	8/19	†
Σ subletal		0	1	3	18	19/19	†

In 142,6 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koagulierte; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

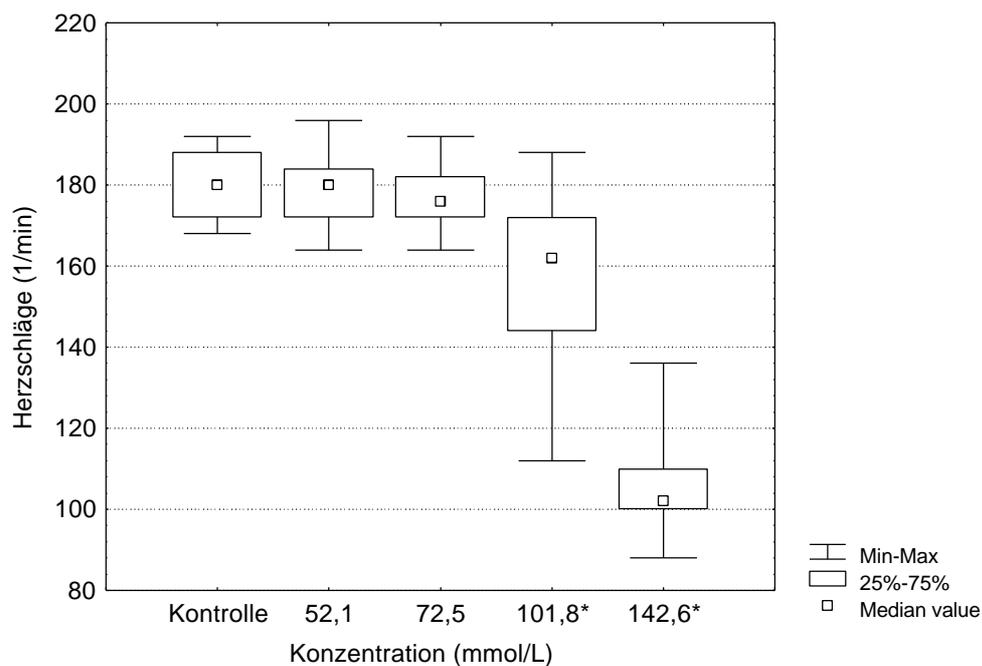


Abb. 55: Wirkung von 2-Propanol auf die Herzschlagfrequenz

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC_{reduzierte Herzschlagfrequenz}: 72,5 / 101,8 mmol/L

Nach 24 Stunden wiesen in der höchsten Konzentration acht der noch lebenden Embryonen (53,3 %) schwere Mißbildungen auf. Sie hatten zum Teil keine Somiten angelegt und weder Kopf noch Schwanz entwickelt. Bei denjenigen, die einen Kopf angelegt hatten, war er deformiert. Bei vier Embryonen (26,7 %) wurden die Symptome eines Spaltembryos beobachtet. Alle diese Embryonen waren so stark geschädigt, daß sie bis zum Meßzeitpunkt nach 48 Stunden abstarben. In 142,6 mmol/L, eine Konzentration, bei der keine letalen Effekte auftraten, wurden dagegen nach 48 Stunden bei insgesamt acht Embryonen (42,1 %) teratogene Effekte festgestellt. Sie wiesen Deformationen der Chorda (10,5 %), des Schwanzes (21,1 %) sowie der Schwanzspitze (5,3 %) auf. Vier Embryonen (21,1 %) hatten ein schlauchförmiges Herz in einem „aufgeblähten“ Perikard entwickelt. In den anderen Konzentrationen traten keine Mißbildungen auf. Eine EC_{50} für diese Effekte kann aufgrund der Datenlage nicht berechnet werden.

Um einen möglichen Einfluß von 2-Propanol auf das Längenwachstum zu erfassen, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 99 zusammengestellt.

Tab. 99: Zusammenstellung der Effekte von 2-Propanol auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 Stunden

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	52,1	72,5	101,8	142,6	199,5
koaguliert ^a	120	1	–	–	–	8/19	20
kein Herzschlag	120	–	–	1	3	3/11	†
kein Blutkreislauf	120	–	–	1	10	7/11	†
Dotteroedem	120	–	–	–	6	2/11	†
Perikardoedem	120	–	–	1	6	6/11	†
Malformationen: Chordadeformation (Schwanz)	120	–	–	–	–	1/11	†
Schwanzdeformation	120	–	–	1	8	6/11	†
Veränderung des Dotters	120	–	–	1	8	4/11	†
Σ teratogen		0	0	1	8	6/11	†
Σ subletal		0	0	1	10	9/11	†

Anzahl der Larven in 142,6 mmol/L n = 19, sonst je „Konzentration“ n = 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : koagulierte und nicht geschlüpfte Embryonen zusammengefaßt

In 142,6 mmol/L waren acht Embryonen (42,1 %) nicht geschlüpft und koaguliert. Die LC_{50} (120 h) beträgt 143,4 mmol/L ($R^2 = 0,999$; $b = 25,5$; $LC_{10} = 127,7$ mmol/L). Nach 120 Stunden ist die LC_{50} damit 15 % kleiner als die LC_{50} (48 h). Durch die verlängerte Testdauer ergibt sich bei 2-Propanol ein Hinweis auf verzögert einsetzende letale Effekte.

Larven, deren Herz-Kreislaufsystem beeinträchtigt war, traten ab 72,5 mmol/L auf. Diese Larven ließen zudem Oedeme an Dotter bzw. Perikard erkennen. Als EC_{50} Herz-Kreislauf (120 h) läßt sich ein Wert von 108,5 mmol/L berechnen ($R^2 = 0,974$; $b = 8,7$; $EC_{10} = 77,3$ mmol/L) und entspricht damit der EC_{50} subletal (120 h) für die Summe der subletalen Effekte nach 120 Stunden.

Diese durch allgemein toxische Effekte geschädigten Larven wiesen zudem Malformationen auf. In 142,6 mmol/L war die Chorda einer Larve (9,1 %) deformiert. Eine Deformation des Schwanzes und des Dotters wurde in 72,5 mmol/L bei einer Larve (5 %), in 101,8 mmol/L bei acht Larven (40 %) und in 142,6 mmol/L bei sechs (54,5 %), respektive bei vier (36,4 %) Larven beobachtet. Nach 120 Stunden beträgt die EC_{50} teratogen 127,8 mmol/L ($R^2 = 0,901$; $b = 6,0$; $EC_{10} = 78,1$ mmol/L). In Abb. 56 sind die nach 120 Stunden gemessenen Schwanzlängen der Larven dargestellt.

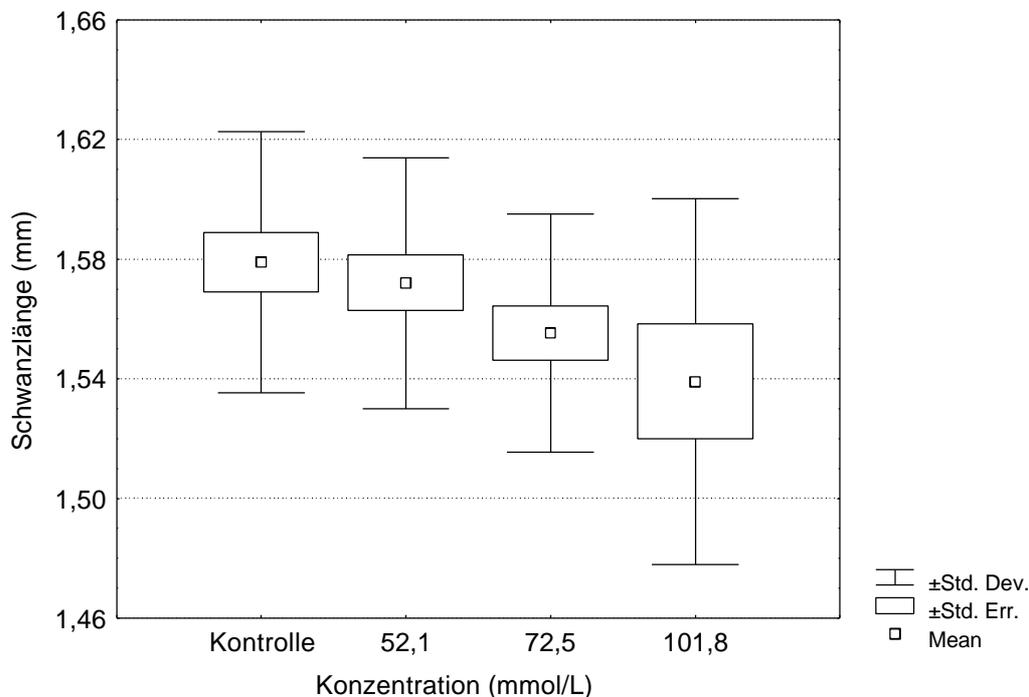


Abb. 56: Wirkung von 2-Propanol auf die Längenentwicklung des Schwanzes

Mit zunehmender Konzentration läßt sich eine Tendenz in der Reduktion der Schwanzlänge erkennen. Bereits in 52,1 mmol/L ist der Mittelwert niedriger als der der Kontrollen. Da in 101,8 mmol/L nur zehn Larven ohne Effekte in die Auswertung einbezogen werden konnten, umfaßt der Standardfehler und die Standardabweichung einen entsprechend weiten Bereich. In keiner Konzentration war die Schwanzlänge signifikant reduziert ($p = 0,05$).

Die berechneten EC_{50} , LC_{50} und $NOEC$ / $LOEC$ sind in Tab. 100 zusammengefaßt.

Tab. 100: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 2-Propanol

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	168,7
LC ₅₀	120	143,4 (136,1 – 151,1)
EC ₅₀ Entwicklungsverzögerung	8	85,5 (79,5 – 91,9)
EC ₅₀ Entwicklungsverzögerung	24	129,5 (116,5 – 152,6)
EC ₅₀ Herz-Kreislauf	48	82,3 (75,1 – 90,2)
EC ₅₀ Herz-Kreislauf	120	108,5 (96,8 – 121,7)
EC ₅₀ subletal	48	85,3 (79,5 – 91,6)
EC ₅₀ subletal	120	108,5 (96,8 – 121,7)
EC ₅₀ teratogen	120	127,8 (104,1 – 156,8)
NOEC / LOEC reduzierte Herzschlagfrequenz	48	72,5 / 101,8
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	101,8 / –
TI	120	1,12

Sowohl nach 48 als auch nach 120 Stunden wurden von 2-Propanol verursachte Malformationen beobachtet. Zu beiden Zeiten betraf das Embryonen bzw. Larven, die offensichtlich durch die allgemein toxische Wirkung der Substanz geschädigt waren. Für die teratogenen Effekte nach 48 Stunden kann keine EC₅₀ teratogen und folglich kein Teratogenitätsindex TI berechnet werden. Für 120 Stunden ist ein Vergleich der letalen und der teratogenen Wirkung möglich. Allerdings werden hier die teratogenen Effekte teilweise von den letalen Effekten überdeckt. Der nach 120 Stunden ermittelte TI von 1,12 spiegelt den geringen Abstand zwischen EC₅₀ teratogen und LC₅₀ wider. Dennoch wurden sowohl nach 48 als auch nach 120 Stunden teratogene Effekte in Konzentrationen verursacht, in denen keine letalen Effekte auftraten. 2-Propanol ließ im *DarT* ein teratogenes Potential erkennen.

In der Literatur liegen keine Untersuchungen mit Säugetieren vor, die für 2-Propanol ein eindeutig teratogenes Potential nachweisen. In Untersuchungen an Ratten überwogen die embryoletalen Effekte. Trächtigen Tieren wurden 0,018 – 1.008 mg/kg appliziert. Das führte bei 31 % der Embryonen zum Tod und bei 14 % zu Malformationen (Shepard, 1992).

3.19 Retinoide

3.19.1 all-trans-Retinol

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurde all-trans-Retinol in den Konzentrationen 0,042; 0,129; 0,384; 1,152 und 3,491 µmol/L untersucht. DMSO wurde als Lösungsvermittler eingesetzt (14,1 mmol/L). Im Kontrollmedium, der Lösungsvermittlerkontrolle und den Testlösungen lagen Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 32 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da bei nicht mehr als 5 % der Kontrollembryonen Effekte auftraten (siehe Tab. 101 und Tab. 102).

Nur in der höchsten untersuchten Konzentration koagulierten Embryonen (Tab. 101). Die mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode berechnete LC_{50} (48 h) beträgt 2,13 $\mu\text{mol/L}$.

Tab. 101: Zusammenstellung der letalen Effekte von all-trans-Retinol

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)						
		K	DMSO	0,042	0,129	0,384	1,152	3,491
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	–	15
	24	–	–	–	–	–	–	18
	36	–	–	–	–	–	–	18
	48	–	–	–	–	–	–	18

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; K : Kontrolle; DMSO : Lösungsvermittlerkontrolle mit 14,1 mmol/L Dimethylsulfoxid

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tab. 102 aufgeführt. Nach achtstündiger Exposition hatten alle fünf noch lebenden Embryonen in 3,491 $\mu\text{mol/L}$ an den Blastomeren Bläschen abgeschnürt. In 1,152 $\mu\text{mol/L}$ zeigten zwei Embryonen (10 %) diesen Effekt und in 0,384 $\mu\text{mol/L}$ ein Embryo (5 %). Es ist unwahrscheinlich, daß es sich dabei um osmotische Effekte handelt.

In der höchsten Konzentration lebten nach 24 Stunden nur noch zwei Embryonen. Beide hatten den Schwanz nicht vom Dotter abgelöst, ließen keine Spontanbewegung und keine Augenanlage erkennen. Einer dieser beiden hatte zudem keine Somiten. Interessanterweise entwickelte er aber innerhalb der folgenden 24 Stunden schemenhafte Augen. Werden die Beeinträchtigung des Blutkreislaufes und die Entwicklung von Oedemen nach 48 Stunden zusammen betrachtet, ergibt sich für die drei höchsten Konzentrationen eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Für diese Effekte wurde mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode eine EC_{50} (48 h) von 1,24 $\mu\text{mol/L}$ errechnet. Da nach 48 Stunden keine weiteren Embryonen subletale Effekte aufwiesen, entspricht dieser Wert auch der EC_{50} subletal (48 h).

Teratogene Effekte traten an einzelnen Embryonen in den beiden höchsten Konzentrationen auf. Dabei handelte es sich um moderate Deformationen der Chorda bzw. der Schwanzspitze. In 1,152 $\mu\text{mol/L}$ ließen zwei Embryonen (10 %) und in 3,491 $\mu\text{mol/L}$ die beiden lebenden Embryonen (100 %) diese Effekte erkennen. Einer dieser beiden hatte zudem keine Sacculi angelegt. Aufgrund der Datenlage wurde die EC_{50} teratogen (48 h) wiederum mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode berechnet. Es ergab sich ein Wert von 1,80 $\mu\text{mol/L}$.

Tab. 102: Zusammenstellung der subletalen Effekte von all-trans-Retinol auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)						
		K	DMSO	0,042	0,129	0,384	1,152	3,491
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	–	–	–	1
	8	–	–	–	–	1	2	5/5
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	–	–	–	2/2
Somiten nicht angelegt	24	–	–	–	–	–	–	1/2
	36	–	–	–	–	–	–	1/2
	48	–	–	–	–	–	–	1/2
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	–	–	2/2
	36	–	–	–	–	–	–	2/2
	48	–	–	–	–	–	–	2/2
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	–	1/2
	48	–	–	–	–	–	–	1/2
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	–	–	2/2
	36	–	–	–	–	–	–	1/2
	48	–	–	–	–	–	–	1/2
schwacher Blutkreislauf	36	–	–	1	1	–	1	–
	48	–	–	–	–	1	2	–
kein Blutkreislauf	36	1	–	–	–	–	1	2/2
	48	–	–	–	–	–	2	2/2
Dotterödem	48	–	–	1	–	1	8	–
Perikardoedem	48	–	–	–	–	–	1	2/2
<i>Malformationen:</i>								
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	–	1	–
	36	–	–	–	–	–	1	–
	48	–	–	–	–	–	2	1/2
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–	–
	36	–	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	–	1	1/2
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	–	–	–	1/2
Σ teratogen		0	0	0	0	0	2	2/2
Σ subletal		0	0	1	0	1	8	2/2

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; K : Kontrolle; DMSO : Lösungsvermittlerkontrolle mit 14,1 mmol/L Dimethylsulfoxid

Da es nach 48 Stunden Hinweise auf eine Reduktion des Längenwachstums gab, wurden die Embryonen in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. In der höchsten untersuchten Konzentration waren alle Embryonen koaguliert. Weitere Effekte traten nicht auf. In Abb. 57 sind die Schwanzlängen der Larven dargestellt.

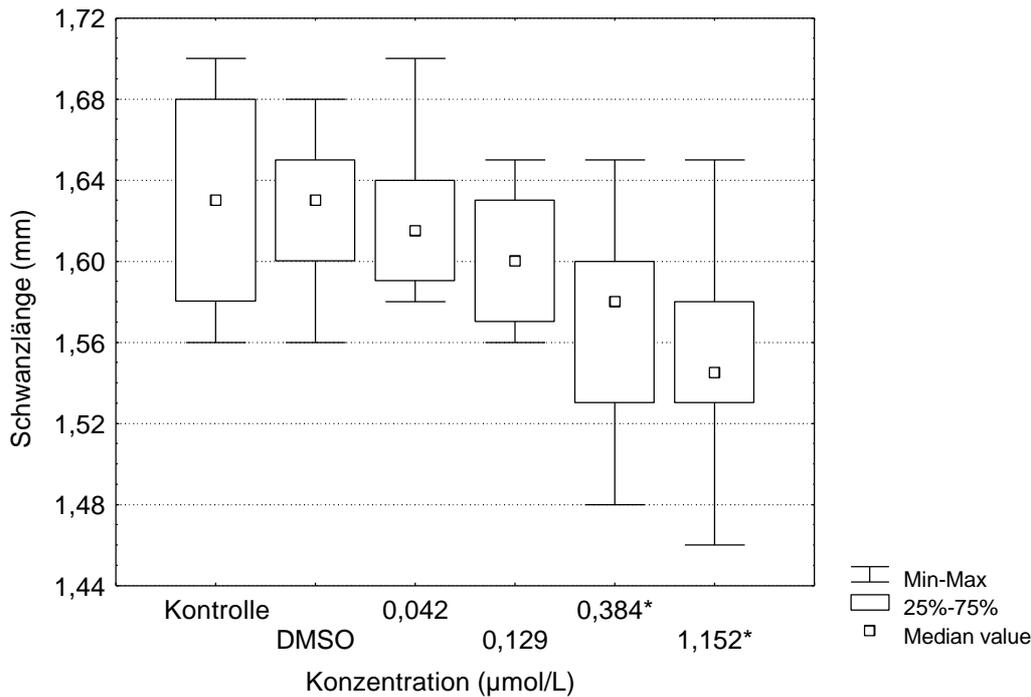


Abb. 57: Wirkung von all-trans-Retinol auf die Längenentwicklung des Schwanzes

DMSO : Lösungsvermittlerkontrolle mit 14,1 mmol/L Dimethylsulfoxid

Kontrolle und Lösungsvermittlerkontrolle haben den gleichen Medianwert von 1,63 mm. Maximalwert, unteres und oberes Quartil der Kontrolle umfassen gegenüber der Lösungsvermittlerkontrolle einen etwas weiteren Bereich. Eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bei der Reduktion der Schwanzlänge ist ab 0,042 µmol/L deutlich zu erkennen. Ab 0,384 µmol/L ist die Schwanzlänge der Larven gegenüber der Lösungsvermittlerkontrolle und der Kontrolle signifikant reduziert ($p = 0,05$).

In Tab. 103 sind die berechneten LC_{50} , EC_{50} und $NOEC / LOEC$ zusammengestellt.

Tab. 103: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für all-trans-Retinol

	Zeit (h)	µmol/L
LC_{50}	48	2,13
EC_{50} Blutkreislauf + Oedeme	48	1,24 (0,94 – 1,65)
EC_{50} subletal	48	1,24 (0,94 – 1,65)
EC_{50} teratogen	48	1,80 (1,55 – 2,08)
$NOEC / LOEC$ reduzierte Schwanzlänge	120	0,129 / 0,384
TI		1,18

All-trans-Retinol verursachte bei den Embryonen von *D. rerio* nur in 1,152 und 3,491 µmol/L Deformationen im Bereich des Schwanzes bzw. an den Sacculi. In der Konzentration von 3,491 µmol/L überwogen die letalen Effekte. In welchem engen Konzentrationsfenster letale Effekte und diese Deformationen zusammen liegen, verdeutlicht der Teratogenitätsindex TI von 1,18. Anders stellt sich die Situation bei der Reduktion der Schwanzlänge (120 h) dar. Sie

war bereits in der niedrigsten untersuchten Konzentration verringert und ab 0,384 $\mu\text{mol/L}$ signifikant reduziert ($p = 0,05$), d.h. in Konzentrationen, in denen sonst keine nennenswerten subletalen Effekte aufgetreten sind. Aufgrund dieser Befunde zeigte sich im *DarT* für all-trans-Retinol ein relativ geringes teratogenes Potential. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.19.3 (Seite 148) dargestellt.

3.19.2 Vitamin A-Säure

Zur Ermittlung einer LC_{50} wurde Vitamin A-Säure in folgenden Konzentrationen untersucht: 2,080; 4,161; 8,321; 16,642 und 33,285 $\mu\text{mol/L}$. Bedingt durch die sehr schlechte Wasserlöslichkeit kam DMSO als Lösungsvermittler (14,1 mmol/L) zum Einsatz. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität lagen im Kontrollmedium, in der Lösungsvermittlerkontrolle und in den Testlösungen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 38 (Anhang A) zusammengestellt.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 104 aufgeführt. Der Test ist valide, da weder in der Kontrolle noch in der Lösungsvermittlerkontrolle letale Effekte auftraten. Vitamin A-Säure wirkte bereits nach kurzer Expositionsdauer akut toxisch. In den beiden höchsten Konzentrationen war nach 2,5 Stunden je ein Embryo (5 %) koaguliert. Bis zum Meßzeitpunkt nach 48 Stunden zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Für die LC_{50} (48 h) wurde ein Wert von 3,629 $\mu\text{mol/L}$ errechnet ($R^2 = 0,939$; $b = 2,6$; $\text{LC}_{10} = 1,158 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 104: Zusammenstellung der letalen Effekte von Vitamin A-Säure

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)						
		K	DMSO	2,080	4,161	8,321	16,642	33,285
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	1	1
	8	–	–	–	6	3	6	6
	24	–	–	2	10	9	10	14
	36	–	–	2	10	12	15	18
	48	–	–	4	14	16	19	20

In Kontrolle und DMSO je 22 Embryonen eingesetzt, sonst je 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; K : Kontrolle; DMSO : Lösungsvermittlerkontrolle mit 14,1 mmol/L Dimethylsulfoxid

Aufgrund der ausgeprägten letalen Wirkung konnten subletale Effekte nicht ausreichend erfaßt werden. Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Test die bedeutend niedrigeren Konzentrationen 0,004; 0,008; 0,013; 0,023 und 0,033 $\mu\text{mol/L}$ untersucht. Als Lösungsvermittler wurde wiederum DMSO (14,1 mmol/L) eingesetzt. Auch bei diesem Test lagen Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums, der Lösungsvermittlerkontrolle und der Testlösungen im zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind der Tab. A 38 (Anhang A) zu entnehmen.

In Tab. 105 sind die subletalen Effekte zusammengestellt. Da nach 48 Stunden nur ein Kontrollembryo (4,5 %) ein Dotteroedem aufwies, ist der Test valide. Nach 2,5 und acht Stunden wurden keine Effekte beobachtet. In den drei höchsten Konzentrationen traten die ersten Effekte nach 24 Stunden auf. Eine gestörte bzw. verzögerte Entwicklung der Augen

wurde zu diesem Zeitpunkt bei zwei Embryonen (10 %) in 0,013 $\mu\text{mol/L}$, bei 16 Embryonen (80 %) in 0,023 $\mu\text{mol/L}$ und bei 19 Embryonen (95 %) in 0,033 $\mu\text{mol/L}$ festgestellt. Für diese Effekte beträgt die EC_{50} (24 h) 0,020 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,987$; $b = 8,6$; $EC_{10} = 0,014 \mu\text{mol/L}$). In 0,013 und 0,023 $\mu\text{mol/L}$ entwickelten sich die diffusen Augenanlagen innerhalb der folgenden 24 Stunden zu normalen Augen. In 0,033 $\mu\text{mol/L}$ blieb die Augenanlage jedoch diffus und 60 % der Embryonen entwickelten überhaupt keine Augen.

Sehr empfindlich reagierten die Embryonen mit der Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems. Diese funktionale Störung wurde in allen Konzentrationen beobachtet. Für den fehlenden Blutkreislauf nach 36 Stunden ergibt sich eine EC_{50} von 0,005 $\mu\text{mol/L}$ ($b = 4,3$; $EC_{10} = 0,002 \mu\text{mol/L}$). Für die Beeinträchtigung des Blutkreislaufes und aufgetretene Oedeme beträgt die EC_{50} (48 h) 0,006 $\mu\text{mol/L}$ ($b = 5,6$; $EC_{10} = 0,003 \mu\text{mol/L}$) und entspricht damit zugleich der $EC_{50 \text{ subletal}}$ für die Summe der subletalen Effekte nach 48 Stunden ($b = 5,2$; $EC_{10} = 0,003 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 105: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Vitamin A-Säure auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)						
		K	DMSO	0,004	0,008	0,013	0,023	0,033
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	–	–	–	1
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	1	5	6
	36	–	–	–	–	–	6	5
	48	–	–	–	–	–	–	6
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	1	11	13
	36	–	–	–	–	1	10	13
	48	–	–	–	–	1	10	12
kein Herzschlag	36	–	–	–	1	–	14	16
	48	–	–	–	–	–	17	18
schwacher Blutkreislauf	36	–	–	2	1	–	–	–
	48	–	–	1	2	–	–	–
kein Blutkreislauf	36	–	–	7	13	20	20	20
	48	–	–	2	9	20	20	20
Dotteroedem	48	1/22	–	5	11	12	4	2
Perikardoedem	48	–	–	1	2	6	7	2
<i>Malformationen:</i>								
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	3	11	10
	36	–	–	–	–	10	1	4
	48	–	–	1	1	13	1	3
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	10	17
	36	–	–	–	2	5	19	19
	48	–	–	–	1	4	19	18
Σ teratogen		0	0	1	2	17	19	20
Σ subletal		1/22	0	7	14	20	20	20

In Kontrolle und DMSO je 22 Embryonen eingesetzt, sonst je 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; K : Kontrolle; DMSO : Lösungsvermittlerkontrolle mit 14,1 mmol/L Dimethylsulfoxid

Teratogene Effekte wurden nach 48 Stunden in allen Konzentrationen festgestellt. Vitamin A-Säure verursachte Deformationen der Chorda und der Schwanzspitze. Zusätzlich hatten in 0,013 $\mu\text{mol/L}$ ein Embryo (5 %), in 0,023 $\mu\text{mol/L}$ zehn Embryonen (50 %) und in 0,033 $\mu\text{mol/L}$ zwölf Embryonen (60 %) keine Augen entwickelt. Aus den teratogenen Effekten läßt sich eine $EC_{50 \text{ teratogen}}$ (48 h) von 0,010 $\mu\text{mol/L}$ berechnen ($R^2 = 0,910$; $b = 5,0$; $EC_{10} = 0,006 \mu\text{mol/L}$).

Die berechneten LC_{50} und EC_{50} sind in Tab. 106 zusammengestellt. Abb. 58 veranschaulicht die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die letalen und die teratogenen Effekte.

Tab. 106: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Vitamin A-Säure

	Zeit (h)	$\mu\text{mol/L}$
LC_{50}	48	3,629 (2,672 – 4,928)
EC_{50} Augenentwicklung	24	0,020 (0,018 – 0,022)
EC_{50} Blutkreislauf	36	0,005 (0,003 – 0,006)
EC_{50} Blutkreislauf + Oedeme	48	0,006 (0,005 – 0,007)
EC_{50} subletal	48	0,006 (0,004 – 0,007)
EC_{50} teratogen	48	0,010 (0,009 – 0,012)
TI		362,90

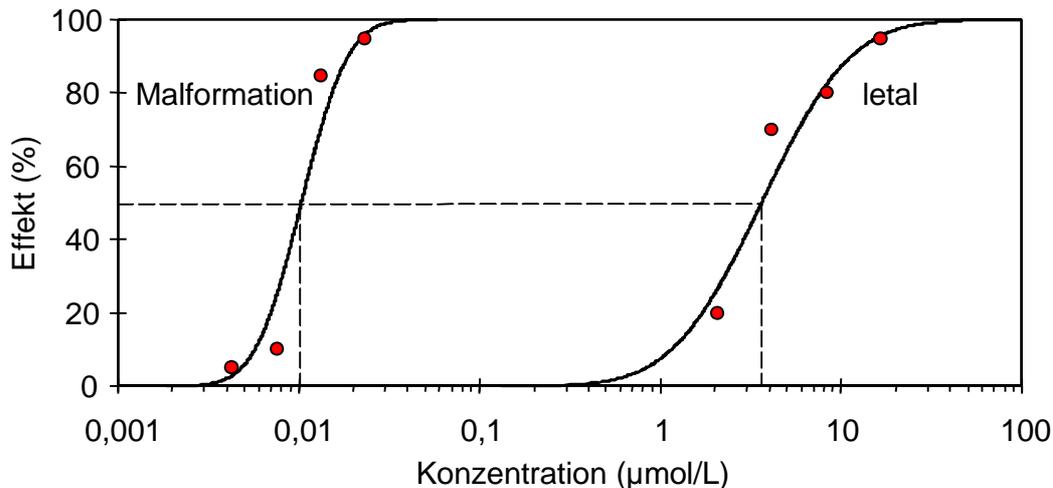


Abb. 58: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Vitamin A-Säure für die teratogenen und die letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 3,629 $\mu\text{mol/L}$; $EC_{50 \text{ teratogen}}$ (48 h): 0,010 $\mu\text{mol/L}$

Die Abszisse in Abb. 58 umfaßt fünf Größenordnungen. Die Konzentrations-Wirkungskurve für die Malformationen ($b = 5,0$) verläuft steiler als die für die letalen Effekte ($b = 2,6$). Teratogene Effekte manifestierten sich im eindeutig subletalen Konzentrationsbereich, der über zwei Größenordnungen unter dem der letalen Effekte lag. Der Teratogenitätsindex TI von 362,90 belegt, daß das aus Untersuchungen mit Säugetieren bekannte teratogene Potential dieser Substanz auch im Test mit Embryonen von *D. rerio* nachgewiesen werden kann. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.19.3 dargestellt.

3.19.3 Retinoide – zusammenfassende Betrachtung

Vitamin A-Mangel verursacht bei Ratten und Kaninchen vielfältige kongenitale Mißbildungen wie z.B. Anomalien der Augen, des Urogenitalsystems und des Herzens. Beim Kaninchen tritt zusätzlich Hydrocephalus als Effekt auf (Shepard, 1992). Teratogene Effekte werden auch durch Exposition gegenüber hohen Dosen von all-trans-Retinol und Vitamin A-Säure verursacht.

All-trans-Retinol wird zu Vitamin A-Säure metabolisiert, die als das eigentliche Teratogen gilt und der ein etwa 20fach höheres teratogenes Potential zukommt als all-trans-Retinol (Kochhar et al., 1988). Nach Creech Kraft et al. (1989) zeigt cis-Vitamin A-Säure ein erheblich geringeres teratogenes Potential als die trans-Form. Klug et al. (1989) bestätigten diese Einschätzung nach Untersuchungen mit „Whole Embryo Culture“ von Rattenembryonen. Sie wiesen nach, daß die Teratogenität der cis-Form durch die Isomerisierung zur all-trans-Form verursacht worden war.

Als möglicher Wirkmechanismus von Vitamin A-Säure kommt eine Bindung an spezifische Retinoidrezeptoren in Frage. Durch diese Interaktion kann eine Kaskade von Regulationsvorgängen ausgelöst werden, mit dem Resultat der Aktivierung spezifischer Gengruppen (z.B.: Hoxgene). Bei der Musterbildung während der Organogenese kommt Vitamin A-Säure eine wesentliche Bedeutung zu, beispielsweise bei der Entwicklung von Wirbelsäule und Extremitäten. Verzögerte oder zeitlich falsche Aktivierung dieser Gene kann eine abnorme Entwicklung induzieren (Marquardt & Schäfer, 1994). Des weiteren wird die Hemmung der Knorpelentwicklung und eine Beeinträchtigung der Bildung von Knochen-Gewebe-Verbindungen diskutiert (Biesalski, 1989).

Im Tierversuch wurden durch all-trans-Retinol teratogene Effekte wie Malformationen des Neuralrohres und der Extremitäten, Mißbildungen der Augen sowie Gaumenspalten verursacht (Biesalski, 1989). Nach Lewis (2000) sind beim Menschen durch all-trans-Retinol verursachte kraniofaziale Anomalien und Mißbildungen des Urogenitalsystems bekannt.

Hendrickx et al. (1980) beschreiben vor allem Malformationen des Gesichtsschädels bei Primaten (*Macaca mulatta*) nach einer Applikation von 20 bzw. 40 mg/kg Vitamin A-Säure zwischen dem 24. und 35. Gestationstag. In einer Studie mit *Macaca nemestrina* verursachten 10 mg/kg/Tag Vitamin A-Säure (20. – 44. Gestationstag) Malformationen des Skelett- und Urogenitalsystems sowie Gaumenspalte, deformierte Ohren und weitere kraniofaziale Mißbildungen (Newell-Morris et al., 1980). Wird Vitamin A-Säure in einer frühen Phase der Trächtigkeit appliziert, sind vor allem Kopf und sensorische Organe betroffen. Die Exposition zu einem späteren Zeitpunkt verursacht hauptsächlich Malformationen der Extremitäten und des Urogenitalsystems.

Kraniofaziale Mißbildungen wurden an Rattenembryonen in „Whole Embryo Culture“ durch 0,14 mmol/L all-trans-Retinol verursacht. Vitamin A-Säure dagegen hemmt in vitro die Knorpelentwicklung von isolierten Zellen der Gliedmaßenanlage bereits ab 0,3 µmol/L. In einem weiteren in vitro-Modell mit Gewebekulturen des Gaumens hemmten 2,5 µmol/L all-trans-Retinol bzw. 1 µmol/L Vitamin A-Säure das Verwachsen der Gaumenbögen. Vitamin

A-Säure zeigt demnach ein bedeutend höheres teratogenes Potential als all-trans-Retinol (Biesalski, 1989).

Im *DarT* verursachte Vitamin A-Säure vergleichbare Effekte wie all-trans-Retinol: Deformationen der Chorda und der Schwanzspitze (Tab. 107).

Tab. 107: Phänomenologische Zusammenfassung der im *DarT* beobachteten teratogenen Effekte

Effekt	all-trans-Retinol	Vitamin-A-Säure
Chordadeformation	●	●
Schwanzspitze	●	●
Sacculi nicht angelegt	●	
reduzierte Schwanzlänge	●	nicht bestimmt

Eine gestörte Entwicklung der Sacculi bzw. Otolithen wurde nur von all-trans-Retinol verursacht. Im Unterschied zu all-trans-Retinol wurden bei den Untersuchungen mit Vitamin A-Säure nicht nur einzelne Embryonen mit Malformationen beobachtet. Wie der Tab. 108 zu entnehmen ist, liegt die $EC_{50 \text{ teratogen}}$ bei Vitamin A-Säure um zwei Größenordnungen unter der von all-trans-Retinol. Die Reduktion der Schwanzlänge wurde nur bei all-trans-Retinol bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* spiegeln die Einordnung dieser beiden Substanzen beim Säuger wider.

Tab. 108: Zusammenstellung von $EC_{50 \text{ teratogen}}$ (48 h) und $LOEC_{\text{reduzierte Schwanzlänge}}$ (120 h)

	$EC_{50 \text{ teratogen}}$ ($\mu\text{mol/L}$)	$NOEC / LOEC_{\text{reduzierte Schwanzlänge}}$ ($\mu\text{mol/L}$)
all-trans-Retinol	1,80	0,129 / 0,384
Vitamin A-Säure	0,01	nicht bestimmt

Herrmann (1995) untersuchte verschiedene Retinoide mit Embryonen von *D. rerio*. Danach verursachte Retinol in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ die Reduktion der Schwanzlänge, Kopfdeformationen (inklusive Otolithen) sowie Mißbildungen des Schwanzes. Vitamin A-Säure reduzierte die Schwanzlänge bereits ab 0,03 $\mu\text{mol/L}$ und verursachte ab 0,01 $\mu\text{mol/L}$ Gehirn- und Schwanzdeformationen. Die beobachteten Effekte und die Konzentrationen, in denen diese ausgelöst wurden, stimmen gut mit den Ergebnissen aus *DarT* überein.

3.20 Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat

Aufgrund der Ergebnisse mehrerer Vorversuche wurden letztlich folgende Konzentrationen untersucht: 46,5; 60,2; 78,4; 102,2 und 132,7 mmol/L. Sowohl im Kontrollmedium als auch in den Testlösungen lagen Sauerstoffsättigung und pH-Werte in dem für den Test zulässigen Bereich. Ab 60,2 mmol/L wurden für die Osmolarität Werte zwischen 110 und 231 mOsmol/L bestimmt. Bis auf in der geringsten Konzentration können osmotische Effekte nicht ausgeschlossen werden. Die Meßwerte sind in Tab. A 33 (Anhang A) zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nur ein Kontrollembryo (5 %) nach 48 Stunden ein Dotterödem aufwies (siehe Tab. 109 und Tab. 110).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 109 zusammengestellt. Bereits nach 12 Stunden waren in 78,4 mmol/L ein (5 %), in 102,2 mmol/L acht (42,1 %) und in 132,7 mmol/L 19 Embryonen (95 %) abgestorben. Nach weiteren zwölf Stunden waren in der höchsten Konzentration alle Embryonen koaguliert. In den übrigen Konzentrationen traten keine weiteren letalen Effekte auf. Die LC_{50} (48 h) beträgt 102,1 mmol/L ($b = 17,2$; $LC_{10} = 86,0$ mmol/L).

Tab. 109: Zusammenstellung der letalen Effekte von Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	46,5	60,2	78,4	102,2	132,7
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	12	–	–	–	1	8/19	19
	24	–	–	–	1	8/19	20
	48	–	–	–	1	8/19	20

In 46,5 mmol/L und in 102,2 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 110 sind die subletalen Effekte zusammengestellt. Im Bereich der letalen Wirkung der Substanz wurde bereits frühzeitig ein Entwicklungsstopp festgestellt. In 102,2 mmol/L bildeten sieben Embryonen (36,8 %) und in 132,7 mmol/L alle Embryonen keine hohe Blastula aus. In den folgenden zehn Stunden starben diese Embryonen ab. Nur einer in 132,7 mmol/L hatte mit der Gastrulation begonnen, war aber nach 24 Stunden ebenfalls koaguliert. Für die Störung der frühen Ontogenese läßt sich eine EC_{50} (2,5 h) von 102,9 mmol/L errechnen ($R^2 = 0,997$; $b = 32,6$; $EC_{10} = 94,0$ mmol/L).

Obwohl die Osmolarität ab der Konzentration von 60,2 mmol/L über dem von Lange et al. (1995) genannten Grenzwert von 100 mOsmol lag, fanden sich keine abgeschnürte Bläschen an den Blastomeren oder am Dottermaterial. Im weiteren Testverlauf traten kaum Effekte auf. Nach 48 Stunden wurden vereinzelt Dotterödeme beobachtet. Wie der Abb. 59 zu entnehmen ist, waren die Herzschlagfrequenzen nicht signifikant verändert ($p = 0,05$). Auffällig ist, daß die Werte in 46,5, 60,2 und 102,2 mmol/L sehr stark streuen. Die Mediane sind jedoch nahezu identisch.

Tab. 110: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	46,5	60,2	78,4	102,2	132,7
keine hohe Blastula	2,5	–	–	–	–	7/19	20
Gastrulation nicht beendet	12	–	–	–	–	–	1/1
keine Spontanbewegung	24	–	–	1	–	–	–
Dotterödem	48	1	–	1	2/19	–	†
Σ teratogen		0	0	0	0	0	†
Σ subletal		1	0	1	2/19	0	†

In 46,5 mmol/L und in 102,2 mmol/L wurden 19 Embryonen exponiert, sonst je 20 Embryonen. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koagulierte; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

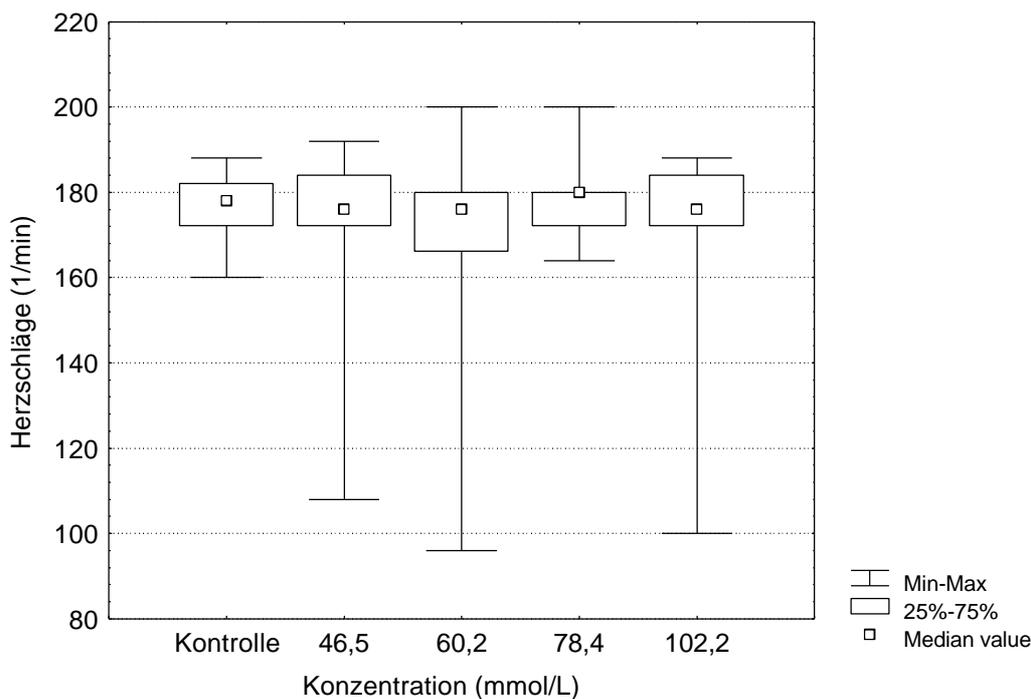


Abb. 59: Wirkung von Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat auf die Herzschlagfrequenz

Malformationen traten weder im letalen noch im subletalen Konzentrationsbereich auf. Um einen möglichen Einfluß der Substanz auf das Längenwachstum zu erfassen, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen änderte sich im Vergleich zu 48 Stunden nicht. Die Verlängerung der Testdauer ergab nach Beendigung der Exposition keinen Hinweis auf verzögert einsetzende letale Effekte. In 102,2 mmol/L war bei einem Embryo (9,1 %) ein

Dotterödem ausgebildet. Weitere subletale Effekte wurden nicht festgestellt. In Abb. 60 sind die Schwanzlängen der Larven nach 120 Stunden dargestellt.

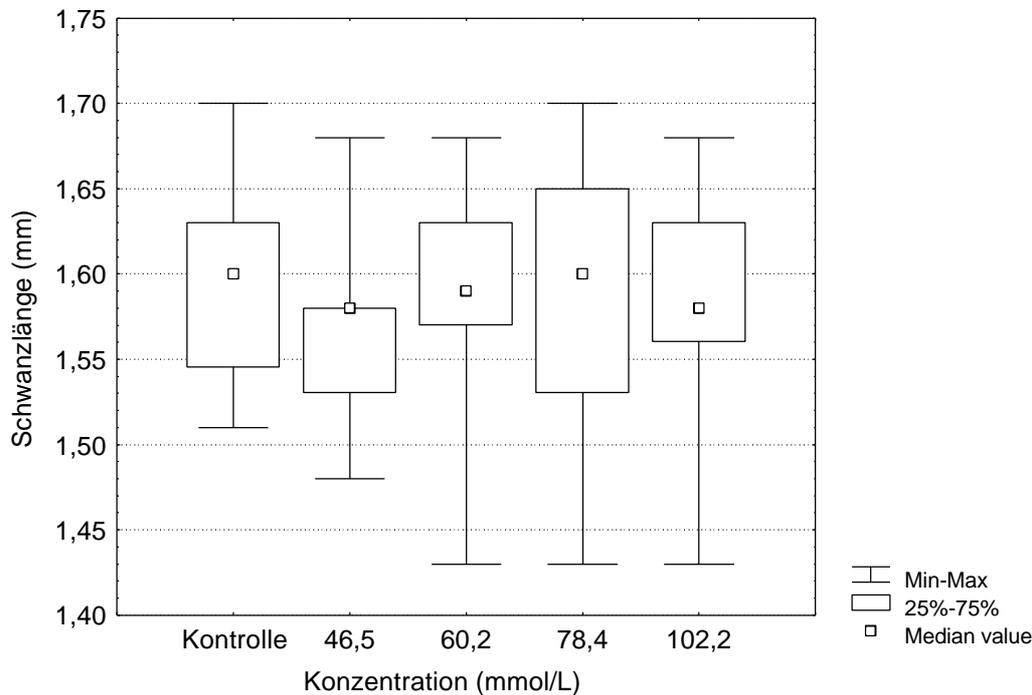


Abb. 60: Wirkung von Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat auf die Längenentwicklung des Schwanzes

Nach 120 Stunden waren die Schwanzlängen gegenüber den Kontrollen nicht signifikant reduziert ($p = 0,05$). Es fällt auf, daß die Minimal- und Maximalwerte weit streuen. In Tab. 111 sind die berechneten LC_{50} , EC_{50} und $NOEC / LOEC$ zusammengestellt.

Tab. 111: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat

	Zeit (h)	mmol/L
LC_{50}	48	102,1 (95,3 – 109,4)
EC_{50} frühe Ontogenese	2,5	102,9 (98,7 – 107,3)
$NOEC / LOEC$ reduzierte Herzschlagfrequenz	48	102,2 / –
$NOEC / LOEC$ reduzierte Schwanzlänge	120	102,2 / –

Lorke (1969) testete Saccharin (CAS: 81-07-2) an trächtigen Mäusen. Er applizierte vom 6. bis 15. Gestationstag täglich 25 mg/kg und erhielt kein Hinweis auf teratogenen Effekte. In einer Langzeitstudie an Mäusen ging von Saccharin kein teratogenes Potential aus (Kroes et al., 1977). Nach Shepard (1992) wurden auch am Modellorganismus Ratte keine durch Saccharin verursachten teratogenen Effekte nachgewiesen.

Diese als nicht säugerteratogen eingestufte Substanz (Shepard, 1992) verursachte in den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* ebenfalls keine teratogenen Effekte.

3.21 Salicylate

3.21.1 Acetylsalicylsäure

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde Acetylsalicylsäure in den Konzentrationen 111, 155, 216, 305 und 427 $\mu\text{mol/L}$ untersucht. Sauerstoffsättigung, Osmolarität und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Nur in 305 und 427 $\mu\text{mol/L}$ lagen die pH-Werte zu Beginn des Testes unter 4,5, weshalb eine Beeinträchtigung der Embryonen durch den niedrigen pH-Wert nicht ausgeschlossen werden kann. Die Meßwerte sind in Tab. A 3 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da bei den Kontrollembryonen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 112 und Tab. 113).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 112 aufgeführt. Die letalen Effekte nahmen konzentrations- und zeitabhängig zu. Die LC_{50} (48 h) beträgt 296 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,984$; $b = 11,1$; $\text{LC}_{10} = 227 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 112: Zusammenstellung der letalen Effekte von Acetylsalicylsäure

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	111	155	216	305	427
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	2	18
	48	–	–	–	1	13	19

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die durch Acetylsalicylsäure verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 113 zusammengestellt. Nennenswerte Effekte traten erst nach 48 Stunden auf. Das Herz-Kreislaufsystem war ab 155 $\mu\text{mol/L}$ beeinträchtigt. Werden die Effekte bei den Endpunkten „Herzschlag“ und „Blutkreislauf“ zusammengefaßt, waren in 155 $\mu\text{mol/L}$ zwei (10 %), in 216 $\mu\text{mol/L}$ 16 (84,2 %) und in 305 $\mu\text{mol/L}$ alle sieben lebenden Embryonen (100 %) betroffen. Für diese Effekte wurde eine EC_{50} (48 h) von 185 $\mu\text{mol/L}$ berechnet ($R^2 = 0,999$; $b = 16,8$; $\text{EC}_{10} = 155 \mu\text{mol/L}$). In den beiden höchsten Konzentrationen wiesen alle lebenden Embryonen nach 48 Stunden im Vergleich zu den Kontrollen eine stark reduzierte Pigmentierung auf. Die für die Summe der subletalen Effekte berechnete $\text{EC}_{50 \text{ subletal}}$ (48 h) beträgt 176 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,983$; $b = 16,6$; $\text{EC}_{10} = 147 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 113: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Acetylsalicylsäure auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	111	155	216	305	427
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	–	1	–
kein Herzschlag	48	–	–	–	4/19	7/7	1/1
schwacher Blutkreislauf	48	–	–	2	–	–	–
kein Blutkreislauf	48	–	–	–	16/19	7/7	1/1
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	–	7/7	1/1
Dotterödem	48	–	–	5	14/19	1/7	–
Perikardoedem	48	–	–	3	11/19	2/7	–
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	1	–	–	–
	48	–	–	1	–	1/7	–
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	1/7	–
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	–	–	1/1
Σ teratogen		0	0	1	0	2/7	1/1
Σ subletal		0	0	7	18/19	7/7	1/1

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Malformationen wurden nur an einzelnen Embryonen beobachtet. Eine Deformation der Chorda trat bei einem Embryo (5 %) in 155 $\mu\text{mol/L}$ und bei einem Embryo (14,3 %) in 305 $\mu\text{mol/L}$ auf. Bei einem weiteren Embryo (14,3 %) dieser Konzentration war die Schwanzspitze deformiert. Der einzige nach 48 Stunden noch lebende Embryo in der höchsten Konzentration hatte keine Sacculi angelegt. Aus diesen Daten wurde mittels "Spearman-Kärber" Methode eine $EC_{50 \text{ teratogen}}$ von 322 $\mu\text{mol/L}$ berechnet, die damit über der LC_{50} (48 h) liegt. Da es nach 48 Stunden ein Hinweis auf Wachstumsreduzierung gab, wurden die Embryonen in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Die beobachteten Effekte sind in Tab. 114 zusammengestellt.

In der höchsten Konzentration waren alle und in 305 $\mu\text{mol/L}$ 14 Embryonen (70 %) koaguliert. Die LC_{50} (120 h) beträgt 267 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,988$; $b = 16,7$; $LC_{10} = 224 \mu\text{mol/L}$) und liegt damit 10 % unter der LC_{50} (48 h). Durch die Verlängerung des Testzeitraumes ergab sich für Acetylsalicylsäure nach Beendigung der Exposition ein Hinweis auf verzögert einsetzende letale Effekte.

Fünf Larven (26,3 %) in 216 $\mu\text{mol/L}$ und drei Larven (50 %) in 305 $\mu\text{mol/L}$ ließen keinen Blutkreislauf erkennen. Oedeme wurden in 155 $\mu\text{mol/L}$ bei vier (20 %), in 216 $\mu\text{mol/L}$ bei sieben (36,8 %) und in 305 $\mu\text{mol/L}$ bei vier Larven (66,7 %) festgestellt. Die $EC_{50 \text{ Oedeme}}$ entspricht zugleich der $EC_{50 \text{ subletal}}$ (120 h) von 248 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,988$; $b = 4,3$; $EC_{10} = 125 \mu\text{mol/L}$). In 155 und 305 $\mu\text{mol/L}$ wurden die Deformationen der Chorda bzw. der Schwanzspitze bei den Larven bestätigt, die diese Effekte bereits nach 48 Stunden als

Embryonen aufwiesen. Die nach 120 Stunden gemessenen Schwanzlängen sind in Abb. 61 dargestellt.

Tab. 114: Zusammenstellung der Effekte von Acetylsalicylsäure auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 Stunden

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	111	155	216	305	427
koaguliert	120	–	–	–	1	14	20
kein Blutkreislauf	120	–	–	–	5/19	3/6	†
Dotteroedem	120	–	–	2	7/19	4/6	†
Perikardoedem	120	–	–	2	1/19	1/6	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	120	–	–	1	–	1/6	†
deformierte Schwanzspitze	120	–	–	–	–	1/6	†
Σ teratogen		0	0	1	0	2/6	†
Σ subletal		0	0	4	7/19	4/6	†

Anzahl der Larven je „Konzentration“ $n = 20$. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

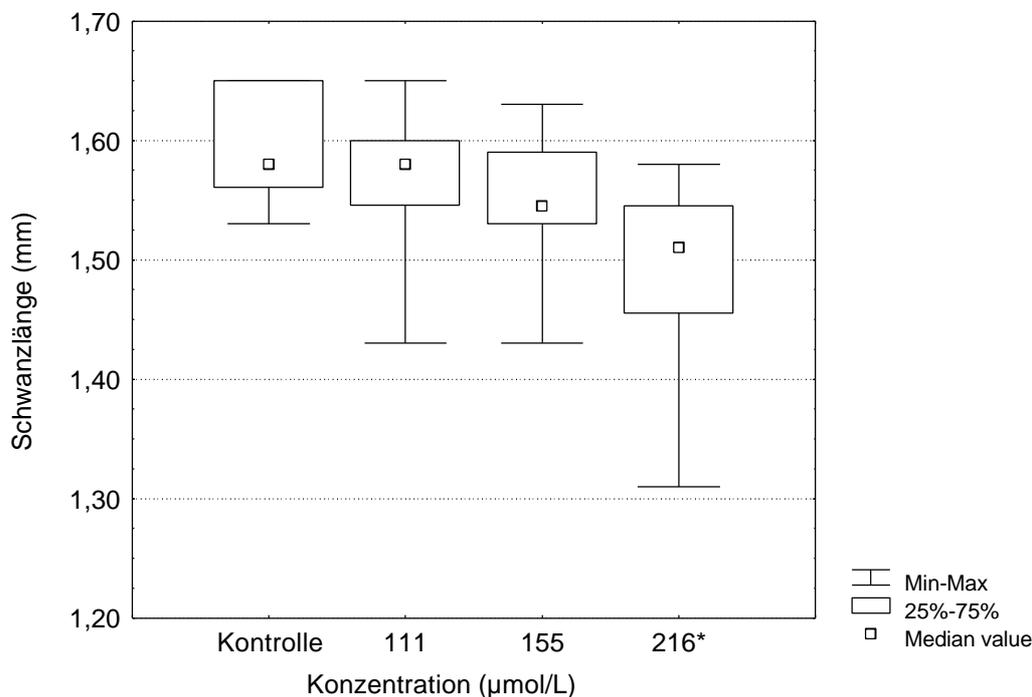


Abb. 61: Wirkung von Acetylsalicylsäure auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge: 155 / 216 $\mu\text{mol/L}$

Ab 155 $\mu\text{mol/L}$ zeigt sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Schwanzlänge, die jedoch erst in 216 $\mu\text{mol/L}$ signifikant ist ($p = 0,05$). In 216 $\mu\text{mol/L}$ gingen nur zwölf Larven in die Auswertung ein, da die anderen sieben Larven subletale Effekte aufwiesen. Die Werte

streuen in allen Konzentrationen deutlich stärker als in der Kontrolle. In Tab. 115 sind die berechneten EC_{50} , LC_{50} und $NOEC / LOEC$ zusammengestellt.

Tab. 115: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Acetylsalicylsäure

	Zeit (h)	$\mu\text{mol/L}$
LC_{50}	48	296 (271 – 323)
LC_{50}	120	267 (249 – 287)
EC_{50} Herz-Kreislauf	48	185 (173 – 199)
EC_{50} subletal	48	176 (164 – 189)
EC_{50} subletal	120	248 (186 – 329)
EC_{50} teratogen	48	322 (285 – 363)
$NOEC / LOEC$ reduzierte Schwanzlänge	120	155 / 216
TI		0,92

Bei den Untersuchungen verursachte Acetylsalicylsäure nur einzelne und leicht ausgeprägte Malformationen an den Embryonen von *D. rerio*. Bis auf eine Ausnahme (155 $\mu\text{mol/L}$: 5 % Chordadeformation) traten diese Effekte in Konzentrationen auf, in denen letale Effekte überwogen. Wird nach 48 Stunden die LC_{50} und die EC_{50} für die teratogenen Effekte ins Verhältnis gesetzt, ergibt sich ein Teratogenitätsindex TI von 0,92. Diese Malformationen werden durch die Letalität überdeckt. Einen empfindlicheren Endpunkt stellte die Reduktion der Schwanzlänge dar. Diese war in der Konzentration von 216 $\mu\text{mol/L}$, in der auch 5 % letale Effekte auftraten, signifikant reduziert ($p = 0,05$).

Obwohl teratogene Effekte verursacht wurden, ließ Acetylsalicylsäure im *DarT* kein deutliches teratogenes Potential erkennen. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.21.3 (Seite 160) dargestellt.

3.21.2 Salicylsäure

Aufgrund der Ergebnisse mehrerer Vorversuche wurde Salicylsäure letztlich in folgenden Konzentrationen untersucht: 105; 126; 151; 181 und 217 $\mu\text{mol/L}$. Sauerstoffsättigung und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lag in dem für den Test zulässigen Bereich. Zu Testbeginn lag in der höchsten Konzentration der pH-Wert mit 4,28 unter der für die Embryonen zu tolerierenden Grenze, stieg bis zum Testende aber auf 5,51 an (siehe Tab. A 34 im Anhang A). Bei der Interpretation der Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß zumindest in der höchsten untersuchten Konzentration letale Effekte durch den niedrigen pH-Wert mit beeinflusst sein könnten. Der Test ist valide, da bei den Kontrollembryonen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 116 und Tab. 117).

Die Anzahl der innerhalb 48 Stunden koagulierten Embryonen ist in Tab. 116 zusammengestellt. In der höchsten Konzentration waren nach 24 Stunden alle Embryonen, in 181 $\mu\text{mol/L}$ 65 % der Embryonen koaguliert. In den folgenden 24 Stunden erhöhte sich der Anteil der abgestorbenen Embryonen in dieser Konzentration auf 80 %. Offensichtlich

wurden die letalen Effekte durch den niedrigen pH-Wert mit beeinflusst. Nach 48 Stunden beträgt die LC₅₀ 178 µmol/L ($R^2 = 0,984$; $b = 46,8$; LC₁₀ = 168 µmol/L).

Tab. 116: Zusammenstellung der letalen Effekte von Salicylsäure

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (µmol/L)					
		Kontrolle	105	126	151	181	217
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	13	20
	48	–	–	–	–	16	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die subletalen Effekte sind in Tab. 117 aufgeführt. Sie traten hauptsächlich in 181 µmol/L auf. Zwei Embryonen (28,6 %) hatten nach 24 Stunden den Schwanz nicht abgelöst, ließen keine Spontanbewegung erkennen, und einer hatte zusätzlich keine Augen entwickelt. Beide Embryonen starben innerhalb der folgenden 24 Stunden ab. Ein dritter Embryo, der nach 24 Stunden keine Spontanbewegung erkennen ließ, kogulierte ebenfalls bis zum Testende. Nach 48 Stunden wurde bei den vier lebenden Embryonen in 181 µmol/L kein Blutkreislauf festgestellt. Einer (25 %) hatte keinen Herzschlag, die drei anderen (75 %) nur einen sehr schwachen. Alle vier Embryonen hatten kaum Melanocyten ausgebildet und wiesen Oedeme an Dotter bzw. Perikard auf. Die mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode nach 48 Stunden ermittelte EC_{50 subletal} beträgt 164 µmol/L.

Tab. 117: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Salicylsäure auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (µmol/L)					
		Kontrolle	105	126	151	181	217
Bläschen abgeschnürt	2,5	–	–	–	–	–	1
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	–	3/7	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	–	2/7	†
	48	–	–	–	–	–	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	1/7	†
	48	–	–	–	–	–	†
schwacher Herzschlag	48	–	–	–	–	3/4	†
kein Herzschlag	48	–	–	–	–	1/4	†
kein Blutkreislauf	48	–	–	–	–	4/4	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	–	4/4	†
Dotteroedem	48	–	–	–	1	2/4	†
Perikardoedem	48	–	–	–	–	2/4	†
<i>Malformationen:</i>							
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	1/7	†
	48	–	–	–	–	1/4	†
Σ teratogen		0	0	0	0	1/4	†
Σ subletal		0	0	0	1	4/4	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Da nur ein Embryo in 181 $\mu\text{mol/L}$ nach 24 und 48 Stunden eine deformierte Schwanzspitze aufwies, konnte eine $\text{EC}_{50 \text{ teratogen}}$ nicht berechnet werden. Um eine mögliche Auswirkung auf das Längenwachstums zu erfassen, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Die dabei beobachteten Effekte sind in Tab. 118 zusammengestellt.

Tab. 118: Zusammenstellung der Effekte von Salicylsäure auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 Stunden

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	105	126	151	181	217
koaguliert	120	–	–	1	–	20	20
Dotteroedem	120	–	–	–	1	†	†
Perikardoedem	120	–	–	–	1	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Säbelschwanz	120	–	–	–	1	†	†
deformierte Schwanzspitze	120	–	–	1/19	–	†	†
Σ teratogen		0	0	1/19	1	†	†
Σ subletal		0	0	1/19	1	†	†

Anzahl der Larven je „Konzentration“ $n = 20$. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Die nach 48 Stunden in 181 $\mu\text{mol/L}$ lebenden vier Embryonen waren nicht geschlüpft und koaguliert. In 126 $\mu\text{mol/L}$ befand sich eine tote Larve. Als LC_{50} (120 h) kann ein Wert von 165 $\mu\text{mol/L}$ angegeben werden (geometrisches Mittel). Da dieser Wert 9 % unter der LC_{50} (48 h) liegt, ergibt sich bei Salicylsäure ein Hinweis auf verzögert auftretende letale Effekte. In 126 $\mu\text{mol/L}$ hatte eine Larve (5,3 %) eine deformierte Schwanzspitze, und in 151 $\mu\text{mol/L}$ wies eine Larve (5 %) einen nach dorsal gebogenen Schwanz („Säbelschwanz“) und jeweils ein Oedem im Bereich des Dotters und des Perikards auf. Aus den vorliegenden Daten konnte keine EC_{50} berechnet werden. In Abb. 62 sind die Schwanzlängen der Larven dargestellt.

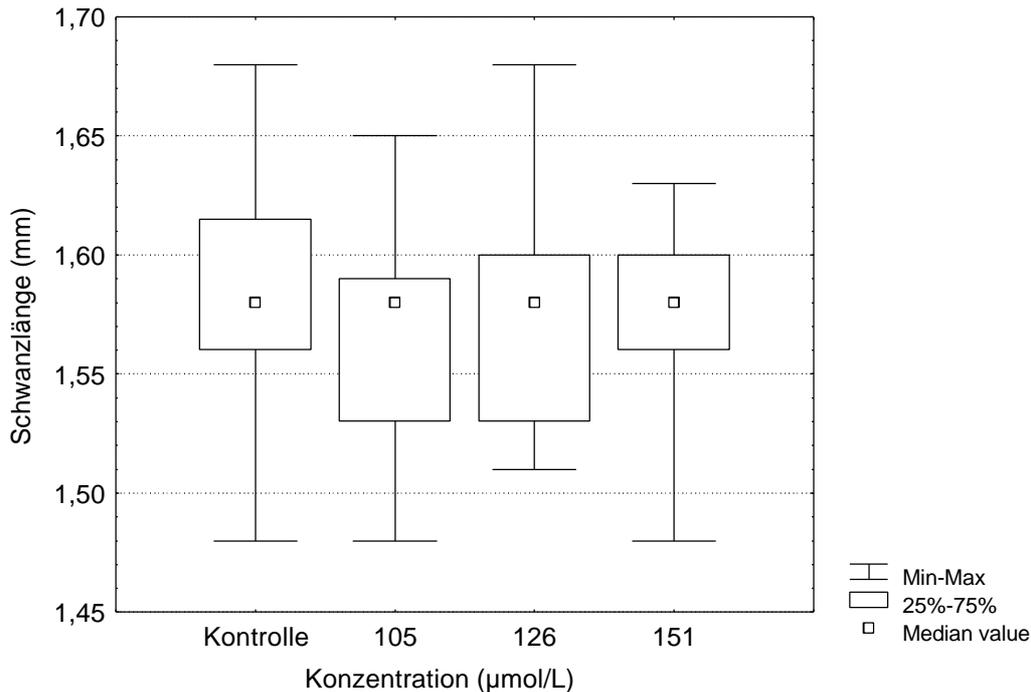


Abb. 62: Wirkung von Salicylsäure auf die Längenentwicklung des Schwanzes

Die Schwanzlänge der Larven war in keiner Konzentration gegenüber den Kontrollen signifikant verändert ($p = 0,05$). Die Mediane haben alle einen Wert von 1,58 mm. Auffällig ist die weite Streuung der Werte. Am weitesten streuen sie in der Kontrolle, obwohl auch hier keine Larven mit subletalen Effekten in die Auswertung eingingen. Die berechneten LC_{50} , EC_{50} und $NOEC / LOEC$ sind in Tab. 119 aufgeführt.

Tab. 119: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Salicylsäure

	Zeit (h)	µmol/L
LC_{50}	48	178 (172 – 185)
LC_{50}	120	165
EC_{50} subletal	48	164 (161 – 166)
$NOEC / LOEC$ reduzierte Schwanzlänge	120	151 / –

Durch Salicylsäure verursachte Effekte traten in einem engen Konzentrationsbereich auf. Die steil verlaufende Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wird bei den letalen Effekten nach 48 Stunden deutlich: 0 % bei 151 µmol/L und 80 % bei 181 µmol/L. Der Faktor zwischen den Konzentrationen beträgt 1,2; folglich war ein weiterer Test mit engerer Konzentrationsabstufung nicht sinnvoll.

Teratogene Effekte traten nur bei einzelnen Embryonen auf. Nach 48 Stunden wurden die Malformationen von den letalen Effekten überdeckt. Die Schwanzlänge der Larven war nach 120 Stunden nicht signifikant reduziert ($p = 0,05$). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß Salicylsäure im *DarT* kein teratogenes Potential erkennen läßt.

3.21.3 Salicylate – zusammenfassende Betrachtung

Smith et al. (1983) ordnen Acetylsalicylsäure als starkes Teratogen im Tierversuch ein. Sowohl bei Maus (oral, 800 mg/kg), Ratte (oral, 100 – 150 mg/kg) und Affe (oral, 100 – 150 mg/kg) wurden teratogene Effekte verursacht. 50 mg/kg/Tag (oral, Gestationstag 10 - 15) führen bei der Katze zu vermehrtem Auftreten von Anomalien, ohne daß spezifische Malformationen dominieren (Khera, 1976).

Salicylsäure verursacht im Tierversuch teratogene Effekte. Nach Lewis (2000) beträgt die TDLo bei der Ratte 350 mg/kg (oral, 8. – 14. Gestationstag). 60 bis 180 mg/kg Natrium-Salicylat verursachen bei der Ratte (iv., 10. – 11. Gestationstag) u. a. Exenzephalie, Gaumenspalte, Augendefekte und Mißbildungen der Rippen und Wirbel (Warkany & Takacs, 1959). Bei der Maus wurden Skelettmißbildungen und Exenzephalie durch 10 mg/kg Natrium-Salicylat verursacht (Shepard, 1992).

Acetylsalicylsäure verursachte im *DarT* nur einzelne Malformationen, hatte aber einen reduzierenden Einfluß auf das Längenwachstum der Embryonen. Das aus säugertoxikologischen Untersuchungen bekannte starke teratogene Potential dieser Substanz konnte im *DarT* allerdings nicht gezeigt werden.

Im Unterschied zu den Befunden an verschiedenen Säugerspezies verursachte Salicylsäure an den Embryonen von *D. rerio* keine teratogenen Effekte. *DarT* liefert demzufolge für Salicylsäure ein falsch negatives Ergebnis.

3.22 Thalidomid und EM 12

3.22.1 Thalidomid

Thalidomid wurde in den Konzentrationen 19,4; 38,7; 77,4; 154,9 und 309,8 µmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung und pH-Werte des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab A 35 (Anhang A) zusammengestellt. Die Osmolarität der Konzentrationen wurde nicht bestimmt. In der höchsten untersuchten Konzentration von 309,8 µmol/L war bereits nach 2,5 Stunden eine unbestimmte Menge Substanz ausgefallen. Diese Konzentrationsangabe ist somit kritisch zu bewerten.

Während des Testes wurden keine letalen Effekte beobachtet. Als subletale Effekte traten nach 48 Stunden einzelne Dotterödem auf (siehe Tab. 120). Da ein Kontrollembryo ebenfalls ein Dotterödem aufwies, lagen diese Effekte im Bereich der biologischen Variabilität. Weitere Effekte traten nicht auf. Es gab keinen Hinweis auf eine mögliche Wachstumsreduzierung.

Tab. 120: Im Test mit Thalidomid beobachtete subletale Effekte an den Embryonen von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	19,4	38,7	77,4	154,9	309,8
Dotterödem	48	1	1	–	1	–	–
Σ teratogen		0	0	0	0	0	0
Σ subletal		1	1	0	1	0	0

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Thalidomid hat eine sehr geringe Wasserlöslichkeit. Jonsson (1972) gibt $155 \mu\text{mol/L}$ an. Nach Neubert & Neubert (1997) lassen sich etwa $387 \mu\text{mol/L}$ lösen. Eigene Untersuchungen zeigten, daß nur weniger als $310 \mu\text{mol/L}$ gelöst werden konnten. Selbst bei Verwendung von $14,1 \text{ mmol/L}$ DMSO (= $0,1 \%$ v/v) als Lösungsvermittler konnte nicht mehr Thalidomid in Lösung gebracht werden. Fort et al. (2000) lösten maximal $1.162 \mu\text{mol/L}$ Thalidomid unter Verwendung von 1% v/v DMSO. Eine solche hohe DMSO-Konzentration kommt im *DarT* nicht zum Einsatz, da eine schädigende Wirkung auf die Embryonen von *D. rerio* nicht ausgeschlossen werden kann (Maiwald, 1997).

Thalidomid hydrolysiert im neutralen Milieu sehr schnell (Halbwertszeit, 37°C : $2,5 - 5 \text{ h}$), und es entstehen bis zu zwölf Hydrolyseprodukte. Das Thalidomid-Derivat a-EM 12 ist besser wasserlöslich und hydrolysiert in weit geringerem Ausmaß als Thalidomid (Neubert & Neubert, 1997). Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen mit dem Thalidomid-Derivat a-EM 12 (folgend als EM 12 bezeichnet) durchgeführt.

3.22.2 EM 12

EM 12 wurde in folgenden Konzentrationen untersucht: $25,9$; $51,8$; $103,6$; $207,3$ und $414,5 \mu\text{mol/L}$. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 11 (Anhang A) zusammengestellt.

Es traten keine letalen Effekte auf. Die subletalen Effekte sind in Tab. 121 zusammengestellt. Der Test ist valide, da nicht mehr als 5% der Kontrollembryonen Effekte aufwiesen. Nach 24 Stunden hatte in $103,6 \mu\text{mol/L}$ ein Embryo (5%) den Schwanz nicht vollständig vom Dotter abgelöst. Er ließ keine Spontanbewegung erkennen und wies eine Deformation des Kopfes und des Schwanzes sowie der Chorda und des Dotters auf. Nach 48 Stunden hatte er zusätzlich keinen Blutkreislauf ausgebildet und ließ ein Perikardoedem erkennen. In $51,8$, $103,6$ und $207,3 \mu\text{mol/L}$ traten zu diesem Zeitpunkt einzelne Embryonen ($5 - 15 \%$) mit folgenden Effekten auf: kein Blutkreislauf, stark verringerte Pigmentierung, Dotter- bzw. Perikardoedem. Bei einem Kontrollembryo (5%) wurde ein Dotterödem festgestellt. Es gab keinen Hinweis auf eine mögliche Reduzierung des Längenwachstums. Für die nur bei einzelnen Embryonen aufgetretenen subletalen Effekte besteht keine Konzentrations-

Wirkungs-Beziehung. Weder für die Malformationen, noch für die Summe der subletalen Effekte konnte eine EC₅₀ berechnet werden.

Tab. 121: Zusammenstellung der subletalen Effekte an EM 12-exponierten Embryonen von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (µmol/L)					
		Kontrolle	25,9	51,8	103,6	207,3	414,5
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	1	–	–
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	1	–	–
	48	–	–	–	1	–	–
kein Blutkreislauf	48	–	–	1	1	–	–
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	–	1	–	–
Dotteroedem	48	1	–	1	2	2	–
Perikardoedem	48	–	–	–	2	–	–
<i>Malformationen:</i>	24	–	–	–	1	–	–
Chordadeformation (Schwanz)	48	–	–	–	1	–	–
Kopfdeformation	24	–	–	–	1	–	–
	48	–	–	–	1	–	–
Schwanzdeformation	24	–	–	–	1	–	–
	48	–	–	–	1	–	–
Veränderung des Dotters	24	–	–	–	1	–	–
	48	–	–	–	1	–	–
Σ teratogen		0	0	0	1	0	0
Σ subletal		1	0	1	3	2	0

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koagulierte; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

3.22.3 Weitere Untersuchungen mit EM 12

Nach Dumpert & Zietz (1984) beträgt die Halbwertszeit von EM 12 in Aquarienwasser etwa zwölf bis 24 Stunden. Deshalb wurde in weiteren Experimenten die Testlösung mit der maximal löslichen Menge EM 12 nach zehn Stunden erneuert. Eigene Untersuchungen zeigten, daß sich höchstens 1.658 µmol EM 12/L Testmedium lösen lassen. Es wurde ebenfalls geprüft, ob das Chorion eine Barriere für die Substanz darstellt.

3.22.3.1 Mechanisches Entchorionieren der Embryonen

Das enzymatische Entfernen des Chorions ist beispielsweise für Eier von *Oryzias latipes* beschrieben (Villalobos et al., 2000). Da Wechselwirkungen zwischen verbleibenden Enzymresten und der Testsubstanz ausgeschlossen werden sollten, wurde bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* das Chorion mechanisch entfernt. Igel (2002) wies zudem nach, daß es bei den Pronase-behandelten dechorionierten Embryonen zu massiven Entwicklungsstörungen kommen kann. In Vorversuchen wurde geklärt, ab welchem

Zeitpunkt ein mechanisches Entchorionieren der Embryonen erfolgen kann, ohne diese in der Ontogenese zu beeinträchtigen. Aufgrund dieser Untersuchungen wurde nach dem Abschluß der Gastrulation (zwölf Stunden nach Befruchtung) das Chorion präparativ entfernt. Zu einem früheren Zeitpunkt ist der Dotter sehr empfindlich und wird durch die Präparation oft zerstört.

3.22.3.2 Pulsuntersuchungen

Die verwendeten Ansätze sind in Tab. 122 dargestellt. Erstmals wurden die Embryonen zum Zeitpunkt t_0 in $1.658 \mu\text{mol/L}$ EM 12 exponiert. Nach zehn Stunden erfolgte eine erneute Exposition. Dazu wurde die Testlösung aus den Wells mittels Pipette entfernt und unverzüglich neue Lösung eingebracht, damit die Embryonen nicht trocken lagen. Entsprechend wurde mit den Kontrollen verfahren.

Tab. 122: Ansätze der Pulsuntersuchungen mit EM 12

	Testbeginn t_0	nach 10 Stunden
Kontrolle	mit Chorion / ohne Substanz	mit Chorion / ohne Substanz
Ansatz 1	mit Chorion / mit Substanz	mit Chorion / mit Substanz
Ansatz 2	mit Chorion / mit Substanz	mit Chorion / ohne Substanz
Ansatz 3	mit Chorion / ohne Substanz	ohne Chorion / mit Substanz
Ansatz 4	mit Chorion / ohne Substanz	ohne Chorion / ohne Substanz

Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. 123 zusammengestellt.

Tab. 123: pH-Wert, Sauerstoffsättigung und Osmolarität von Kontrollmedium und Testlösung ($1.658 \mu\text{mol/L}$ EM 12)

	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle (t_0)	7,41		93,9	n.n.
Ansatz 1 - 4 (t_0)	7,12		93,4	n.n.
Kontrolle (10 h)	7,33	7,03	95,5	n.n.
Ansatz 1 - 4 (10 h)	7,28	Ansatz 1: 6,49 Ansatz 2: 6,63 Ansatz 3: 6,56 Ansatz 4: 6,89	94,1	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tab. 124 zusammengestellt. Letale Effekte wurden nicht verursacht. Da bei den Kontrollen keine Effekte auftraten, erfüllt der Test die Validitätskriterien.

Tab. 124: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 1.658 $\mu\text{mol/L}$ EM 12 auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Kontrolle	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Bläschen abgeschnürt	12	1/20	–	4/10	1/9	2/15
keine Spontanbewegung	24	–	–	–	1/9	–
<i>Malformationen:</i>						
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	1/9	–
	48	–	–	–	1/9	–
Rundrücken	24	–	–	1/10	–	–
	48	–	–	1/10	–	–
Σ teratogen		0	0	1/10	1/9	0
Σ subletal		0	0	1/10	1/9	0

In der Kontrolle wurden 16, im Ansatz 1 19, im Ansatz 2 zehn, im Ansatz 3 neun und im Ansatz 4 15 Embryonen eingesetzt. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Erste Effekte traten nach zwölf Stunden auf. Im Ansatz 2 hatten vier Embryonen (40 %), im Ansatz 3 ein Embryo (11,1 %) und im Ansatz 4 zwei Embryonen (13,3 %) im Bereich der Schwanzknospe Bläschen abgeschnürt. Dieser Effekt wurde auch bei einem Kontrollembryo beobachtet. Ein Embryo (11,1 %) des dritten Ansatzes ließ nach 24 Stunden keine Spontanbewegung erkennen. Dieser Embryo wies zusätzlich eine Deformation der Chorda auf. Im Ansatz 2 hatte ein Embryo (10 %) ab 24 Stunden einen „Rundrücken“ ausgebildet. Weitere Effekte traten nicht auf.

Um eine Wirkung auf das Längenwachstum zu erfassen, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. Als einziger Effekt wurde der „Rundrücken“ der Larve aus Ansatz 2 bestätigt. In Abb. 63 sind die Schwanzlängen der Larven nach 120 Stunden dargestellt.

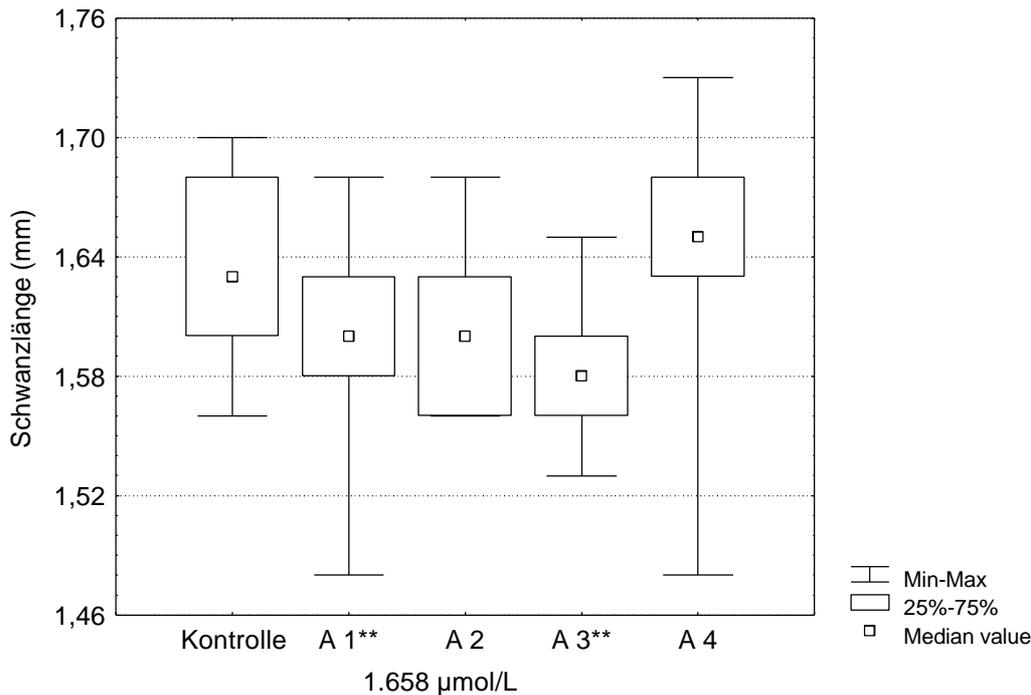


Abb. 63: Wirkung von EM 12 auf die Längenentwicklung des Schwanzes

A 1 : Ansatz 1, A 2, 3, 4 – entsprechend; ** : gegenüber A 4 signifikant reduziert ($p = 0,05$)

Tendenziell sind die Schwanzlängen der in EM 12 exponierten Embryonen (nach 120 Stunden als Larven) in Ansatz 1 bis 3 reduziert. Allerdings konnte gegenüber den Kontrollen keine signifikante Reduktion ($p = 0,05$) nachgewiesen werden. Weiterhin fällt auf, daß die Schwanzlängen der Larven aus Ansatz 4 („dechorionierte Kontrollen“) größer sind als die der natürlich geschlüpften Kontrollen. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied ($p = 0,05$) und die Werte streuen im Ansatz 4 am weitesten. Ein signifikanter Unterschied ($p = 0,05$) zu Ansatz 4 wurde in Ansatz 1 und Ansatz 3 nachgewiesen. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß EM 12 in einer Konzentration von $1.658 \mu\text{mol/L}$ eine leichte Wachstumsreduktion verursacht. Die Daten sind allerdings kritisch zu bewerten, da gegenüber den (unbehandelten) Kontrollen keine signifikante Reduktion der Schwanzlänge festgestellt werden konnte. Ein Einfluß des Chorions auf die Wirkung der Substanz wurde nicht nachgewiesen.

Thalidomid stellt eines der bekanntesten menschlichen Teratogene dar. Als Wirkstoff in Schlaf- und Beruhigungsmitteln kam es Ende der 1950er Jahre bis 1962 in großem Umfang auf den Markt. Es verfügt über eine sehr geringe akute Toxizität und wurde unter anderem auch schwangeren Frauen verschrieben (Marquardt & Schäfer, 1994).

Thalidomid zeigt eine ausgeprägte Speziespezifität. Es ist hoch wirksam beim Menschen und Primaten. Typische Mißbildungen sind Phokomelie und Amelie der Gliedmaßen, Deformation von Humerus und Radius, Malformationen des Beckengürtels, Ohrdeformationen, Abnormitäten des Herzens (Fallot'sche Tetralogie) und des Intestinaltraktes (Neubert & Neubert, 1997; Marquardt & Schäfer, 1994). Bei Untersuchungen mit „Nagern“ (z.B. Ratte) hingegen lassen sich selbst bei hoher Dosierung keine entsprechenden

Fehlbildungen auslösen. Parkhie & Webb (1983) injizierten trächtigen Ratten 45 mg/kg Thalidomid (Gestationstag 10 – 12) und beobachteten Wirbel- und Rippendeformationen. Die „primaten-typischen“ Mißbildungen der Gliedmaßen wurden nicht verursacht, 11 – 24 % der Feten waren resorbiert bzw. abgestorben. Des weiteren wurde Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet, was selbst nicht unerheblich Malformationen auslöste. Beim Kaninchen wurden nach hohen Dosen (50 mg/kg) Mißbildungen in geringem Prozentsatz beobachtet. Die vergleichbare teratogene Dosis beim Primaten beträgt 1 mg/kg (Shepard, 1992).

Schumacher et al. (1972) verabreichten Rhesusaffen (26. bzw. 28. Gestationstag), Kaninchen und Ratten (täglich vom 8. – 11. Gestationstag) orale Dosen von 25 – 250 mg/kg EM 12. Während bei Rhesusaffe und Kaninchen Mißbildungen der Gliedmaßen sowie des Schwanzes und der Wirbelsäule auftraten, wurde an den Rattenfeten keine signifikante Erhöhung der Mißbildungsrate festgestellt. Die intravenöse Injektion von 10 mg/kg verursachte bei den Rattenfeten Mißbildungen von Sternum, unterer Wirbelsäule und Schwanz. „Thalidomid-typische“ Deformationen traten nicht auf.

Ein weiteres Charakteristikum von Thalidomid ist, daß sich entsprechende Fehlbildungen nur in einem schmalen Zeitfenster auslösen lassen. Die empfindliche Phase beim Menschen liegt etwa zwischen dem 20. und 36. Schwangerschaftstag, bei nichtmenschlichen Primaten etwa zwischen dem 24. und 33. Gestationstag. Dies entspricht einem sehr frühen Stadium der Entstehung der Extremitätenanlagen, das noch deutlich vor Ansätzen der Knorpelbildung liegt (Marquardt & Schäfer, 1994; Shepard, 1992). Weiterhin zeigte sich, daß von den Enantiomeren des Thalidomid-Derivates EM 12 die S(-)-Form ein deutlich stärkeres teratogenes Potential besitzt als die R(+)-Form.

Als möglicher Mechanismus für die teratogene Wirkung kommt eine Interaktion von Zell-Zell- bzw. Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen in Frage. Diese Zellinteraktionen stellen typische Mechanismen der Embryonalentwicklung dar. Weiterhin diskutierte Wirkmechanismen sind z.B.: Interaktion mit Nukleinsäuren, Induktion von Zellnekrose und Hemmung der Zellteilung oder Interaktion mit Adhäsionsrezeptoren der Zelloberflächen (Neubert & Neubert, 1997).

Thalidomid und das Thalidomid-Derivat EM 12 zeigten im *DarT* kein teratogenes Potential. Eine hohe Konzentration von EM 12 (1.659 µmol/L) verursachte bei den Embryonen von *D. rerio* eine leichte Wachstumsreduktion. Diese Ergebnisse sind durch die ausgeprägte Speziespezifität von Thalidomid und EM 12 erklärbar.

3.23 Valproinsäure und Strukturanaloga

3.23.1 Valproinsäure

Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen wurde Valproinsäure in den Konzentrationen 56, 73, 94, 123 und 159 $\mu\text{mol/L}$ untersucht. Sauerstoffgehalt, pH-Werte und Osmolarität des Kontrollmediums und der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 37 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da bei den Kontrollen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 125 und Tab. 126).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 125 zusammengestellt. Letale Effekte traten spät auf. Im Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden starben in der höchsten Konzentration 95 % der Embryonen ab. In 73 $\mu\text{mol/L}$ war ein Embryo (5 %) koaguliert. Die LC_{50} nach 48 Stunden beträgt 140 $\mu\text{mol/L}$ (geometrisches Mittel).

Tab. 125: Zusammenstellung der letalen Effekte von Valproinsäure

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	56	73	94	123	159
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	8	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	–	–	1
	48	–	–	1	–	–	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 126 sind die durch Valproinsäure verursachten subletalen Effekte aufgeführt. Nach 24 Stunden hatten in der höchsten Konzentration alle lebenden Embryonen die Gastrulation noch nicht beendet. Diese Embryonen starben innerhalb der folgenden 24 Stunden ab. Ebenfalls nach 24 Stunden wurde eine Störung der Bewegungsaktivität beobachtet. In den beiden geringsten Konzentrationen ließen je 10 %, in 94 und 123 $\mu\text{mol/L}$ alle Embryonen keine Spontanbewegung erkennen. Betrachtet man die Schwanzablösung vom Dotter und die Entwicklung der Augen, läßt sich nach 24 Stunden eine Entwicklungsverzögerung erkennen. Die dafür berechnete EC_{50} (24 h) beträgt 55 $\mu\text{mol/L}$ ($b = 11,0$; $\text{EC}_{10} = 42 \mu\text{mol/L}$). Aus der konzentrationsabhängigen Störung des Herz-Kreislaufsystems nach 48 Stunden berechnet sich eine EC_{50} von 82 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,995$; $b = 22,0$; $\text{EC}_{10} = 71 \mu\text{mol/L}$). Des weiteren traten nach 48 Stunden vermehrt Oedeme auf, woraus sich eine $\text{EC}_{50 \text{ Oedeme}}$ (48 h) von 80 $\mu\text{mol/L}$ berechnet ($R^2 = 0,802$; $b = 5,3$; $\text{EC}_{10} = 46 \mu\text{mol/L}$). 40 % der Embryonen in 123 $\mu\text{mol/L}$ hatten keine Melanocyten ausgebildet. Mittels "Trimmed Spearman-Kärber" Methode läßt sich für die Summe der subletalen Effekte nach 48 Stunden eine $\text{EC}_{50 \text{ subletal}}$ von 79 $\mu\text{mol/L}$ berechnen.

Tab. 126: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Valpronsäure auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	56	73	94	123	
Gastrulation nicht beendet	24	–	–	–	–	–	19/19
keine Spontanbewegung	24	–	2	2	20	20	–
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	20	–	–
	48	–	–	–	–	11	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	1	–	20	–
	48	–	–	–	–	–	†
diffuse Augenanlage	24	–	11	18	20	18	–
	48	–	–	–	–	3	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	–	2	–
	48	–	–	–	–	–	†
kein Herzschlag	48	–	–	–	3	20	†
kein Blutkreislauf	48	–	–	3/19	19	20	†
keine Pigmentierung	48	–	–	–	–	8	†
Dotteroedem	48	–	5	5/19	6	13	†
Perikardoedem	48	–	1	–	11	8	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	1	–	–	–
	48	–	–	–	3	13	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	7	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	1	–	–
	48	–	–	–	3	12	†
Spaltembryo	24	–	–	–	–	3	–
	48	–	–	–	–	1	†
Herzdeformation	48	–	–	–	–	2	†
Otolithen nicht angelegt	48	–	–	–	–	13	†
Σ teratogen		0	0	0	5	20	†
Σ subletal		0	5	5/19	19	20	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Teratogene Effekte traten vor allem in den Konzentrationen 94 und 123 $\mu\text{mol/L}$ auf. Valpronsäure verursachte Deformationen der Chorda und des Schwanzes bzw. der Schwanzspitze. Nach 48 Stunden waren davon 25 % der Embryonen in 94 $\mu\text{mol/L}$ und 85 % in 123 $\mu\text{mol/L}$ betroffen. Die Symptome eines Spaltembryos wiesen nach 24 Stunden drei Embryonen (15 %) in 123 $\mu\text{mol/L}$ auf, nach 48 Stunden wurde nur noch ein Embryo (5 %) mit offener Medianspalte erkannt. Dieses Phänomen wird auch von Sander & Baumann (1983) beschrieben. Die dorsal getrennten Längshälften des Körpers können demzufolge in der weiteren Entwicklung zusammengezogen werden ohne miteinander zu verwachsen. Sie sind dann nicht mehr als offene Medianspalte zu erkennen. Zwei weitere Embryonen (10 %) in dieser Konzentration ließen ein deformiertes Herz erkennen, und 13 Embryonen (65 %)

hatten in den Sacculi keine Otolithen angelegt. Für die EC_{50} teratogen (48 h) wurde ein Wert von $96 \mu\text{mol/L}$ berechnet ($R^2 = 0,993$; $b = 32,9$; $EC_{10} = 88 \mu\text{mol/L}$).

Die Schwanzlänge der Larven nach 120 Stunden wurde in einem früheren Test untersucht ($55, 72, 94, 122$ und $158 \mu\text{mol/L}$). Dabei ergab sich eine erhebliche und schon ab der niedrigsten Konzentration signifikante Reduktion ($p = 0,05$). Die LOEC beträgt somit $55 \mu\text{mol/L}$, eine NOEC kann nicht angegeben werden. In Abb. 64 ist die konzentrationsabhängige Reduktion der Schwanzlänge dargestellt. Es gingen nur zwei Konzentrationen in die Bewertung ein, da die Larven in den anderen Konzentrationen Deformationen des Schwanzes und der Chorda zeigten, die die Messung der Schwanzlänge verfälscht hätten. In $72 \mu\text{mol/L}$ gingen zudem nur neun Larven in die Auswertung ein.

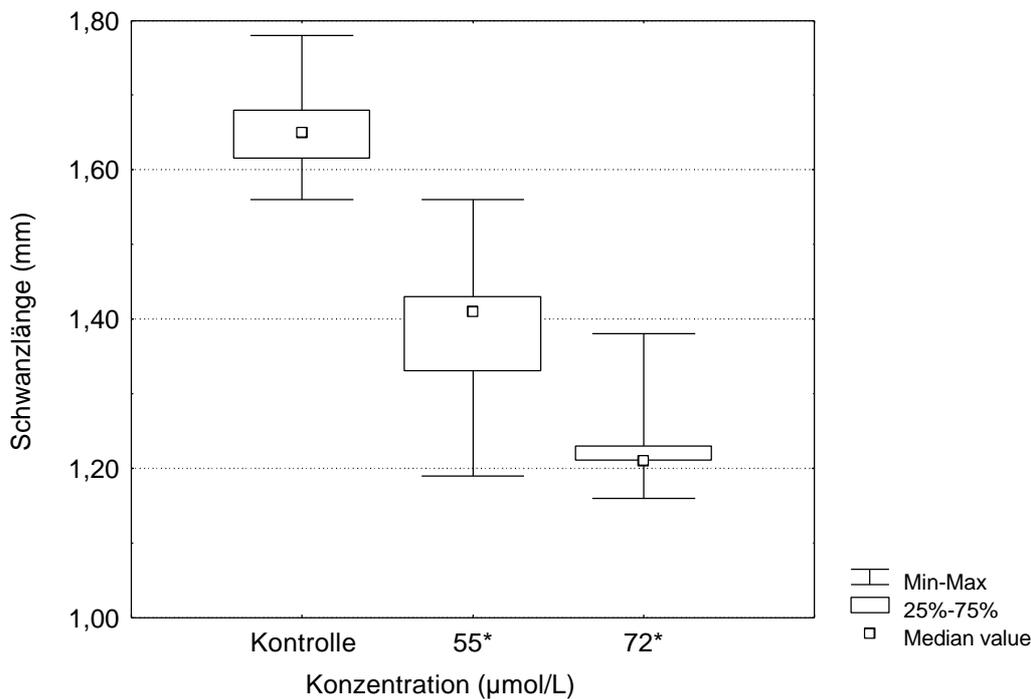


Abb. 64: Wirkung von Valproinsäure auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge: – / $55 \mu\text{mol/L}$

Tab. 127 faßt die berechneten LC_{50} , EC_{50} und NOEC / LOEC zusammen. In Abb. 65 sind Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die letalen und teratogenen Effekte dargestellt.

Tab. 127: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Valpronsäure

	Zeit (h)	$\mu\text{mol/L}$
LC_{50}	48	140
EC_{50} Entwicklungsverzögerung	24	55 (43 – 60)
EC_{50} Herz-Kreislauf	48	82 (77 – 86)
EC_{50} Oedeme	48	80 (70 – 91)
EC_{50} subletal	48	79 (71 – 89)
EC_{50} teratogen	48	96 (91 – 101)
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	– / 55
TI		1,46

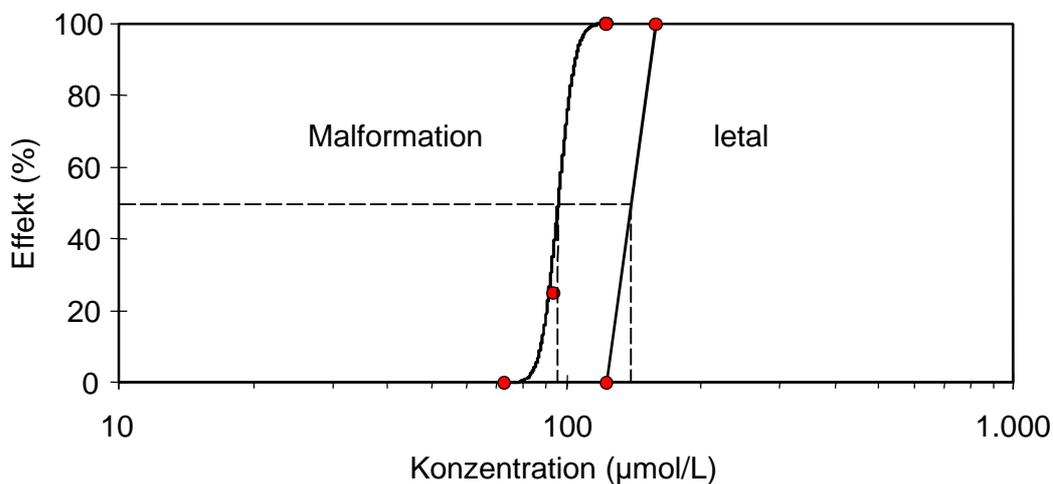


Abb. 65: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Valpronsäure für die teratogenen und die letalen Effekte

LC_{50} (48 h): 140 $\mu\text{mol/L}$; EC_{50} teratogen (48 h): 96 $\mu\text{mol/L}$

Sowohl die Sigmoidale für die Malformationen als auch die Gerade für die letalen Effekte ist sehr steil. Beide Graphen sind im gesamten Verlauf deutlich voneinander getrennt. Teratogene Effekte traten nur im subletalen Konzentrationsbereich auf und wurden nicht von letalen Effekten überdeckt. Für den Teratogenitätsindex TI berechnet sich ein Wert von 1,46. Im *DarT* ließ Valpronsäure ein teratogenes Potential erkennen. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.23.4 (Seite 179) dargestellt.

3.23.2 Valpromid

Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurde Valpromid in den Konzentrationen 3,6; 5,1; 7,1; 10,0 und 14,0 mmol/L untersucht. Sauerstoffsättigung, pH-Werte und Osmolarität lagen im Kontrollmedium und in den Testlösungen in dem für den Test zulässigen Bereich.

Die Meßwerte sind in Tab A 36 (Anhang A) zusammengestellt. Der Test ist valide, da in den Kontrollen keine Effekte auftraten (siehe Tab. 128 und Tab. 129).

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 128 zusammengestellt. Eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der letalen Effekte ist zu erkennen. Aus den nach 48 Stunden koagulierten Embryonen läßt sich eine LC_{50} von 7,9 mmol/L errechnen (Berechnung nach "Trimmed Spearman-Kärber").

Tab. 128: Zusammenstellung der letalen Effekte von Valpromid

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	3,6	5,1	7,1	10,0	14,0
koaguliert	5	–	–	–	–	–	4
	16	–	–	–	–	1	19
	24	–	–	–	–	12	20
	48	–	–	–	4	20	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

In Tab. 129 sind die durch Valpromid verursachten subletalen Effekte an den Embryonen aufgeführt. Bereits nach 16 Stunden wurde in den beiden höchsten Konzentrationen eine Entwicklungsstörung deutlich. Die lebenden Embryonen schlossen die Gastrulation nicht ab, bzw. entwickelten sich, nachdem der Blastoporus geschlossen wurde, nicht weiter. Im weiteren Verlauf des Testes starben alle diese Embryonen ab.

Da im Vorversuch der Hinweis auftrat, daß die Entwicklung der Somiten verzögert sein könnte, wurden nach 16 Stunden die gebildeten Somitenpaare ausgezählt. In Abb. 66 sind die Ergebnisse dargestellt. Ab 3,6 mmol/L war die Anzahl reduziert und ab 5,1 mmol/L wurde eine signifikante Verringerung nachgewiesen ($p = 0,05$).

Embryonen, die nach 24 Stunden keine Spontanbewegung erkennen ließen, traten in 3,6 bis 10,0 mmol/L auf. Betrachtet man die Schwanzablösung vom Dotter und die Entwicklung der Augenanlage, wird nach 24 Stunden ab 5,1 mmol/L eine konzentrationsabhängige Entwicklungsverzögerung deutlich. Die EC_{50} Entwicklungsverzögerung (24 h) beträgt 5,7 mmol/L (Berechnung nach "Trimmed Spearman-Kärber").

In den drei niedrigsten Konzentrationen wurden nach 48 Stunden Effekte beim Herzschlag und Blutkreislauf deutlich. Für die Beeinträchtigung des Blutkreislaufes nach 48 Stunden kann eine EC_{50} von 3,7 mmol/L ermittelt werden ($R^2 = 0,995$; $b = 12,8$; $EC_{10} = 2,9$ mmol/L). In 7,1 mmol/L waren bei keinem Embryo Melanocyten ausgebildet, und in der darunterliegenden Konzentration zeigten zwei Embryonen (10 %) eine stark verringerte Pigmentierung. Oedeme traten vermehrt bei den noch lebenden Embryonen aller Konzentrationen auf (37,5 – 90 %), ließen aber keine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung erkennen. In 7,1 mmol/L war die Störung des Herz-Kreislaufsystems vermutlich so stark, daß bei einem Teil der Embryonen keine Oedeme ausgebildet wurden. Für die Gesamtheit der subletalen Effekte läßt sich die EC_{50} (48 h) von 2,8 mmol/L berechnen ($R^2 = 0,855$; $b = 8,4$; $EC_{10} = 1,9$ mmol/L).

Tab. 129: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Valpromid auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	3,6	5,1	7,1	10,0	14,0
Gastrulation nicht beendet	16	–	–	–	–	3/19	1/1
keine Spontanbewegung	24	–	3	20	20	5/8	†
Somiten nicht angelegt	16	–	–	–	–	15/19	–
	24	–	–	–	–	5/8	†
	48	–	–	–	–	†	†
Schwanz unvollständig abgelöst	24	–	–	–	17	–	†
	48	–	–	–	1/16	†	†
Schwanz nicht abgelöst	24	–	–	–	3	5/8	†
	48	–	–	–	–	†	†
diffuse Augenanlage	24	–	–	3	14	1/8	†
	48	–	–	–	–	†	†
keine Augenanlage	24	–	–	–	3	2/8	†
	48	–	–	–	–	†	†
schwacher Herzschlag	48	–	–	1	–	†	†
kein Herzschlag	48	–	–	–	16/16	†	†
schwacher Blutkreislauf	48	–	–	1	–	†	†
kein Blutkreislauf	48	–	10	18	16/16	†	†
stark verringerte Pigmentierung	48	–	–	2	–	†	†
keine Pigmentierung	48	–	–	–	16/16	†	†
Dotterödem	48	–	18	17	6/16	†	†
Perikardoedem	48	–	–	1	–	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	3/16	†	†
Kopfdeformation	24	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	2/16	†	†
Schwanzdeformation	24	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	5/16	†	†
deformierte Schwanzspitze	24	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	4/16	†	†
veränderte Chordastruktur	24	–	–	–	–	–	†
	48	–	–	–	2/16	†	†
Sacculi nicht angelegt	48	–	–	–	16/16	†	†
Σ teratogen		0	0	0	16/16	†	†
Σ subletal		0	18	19	16/16	†	†

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

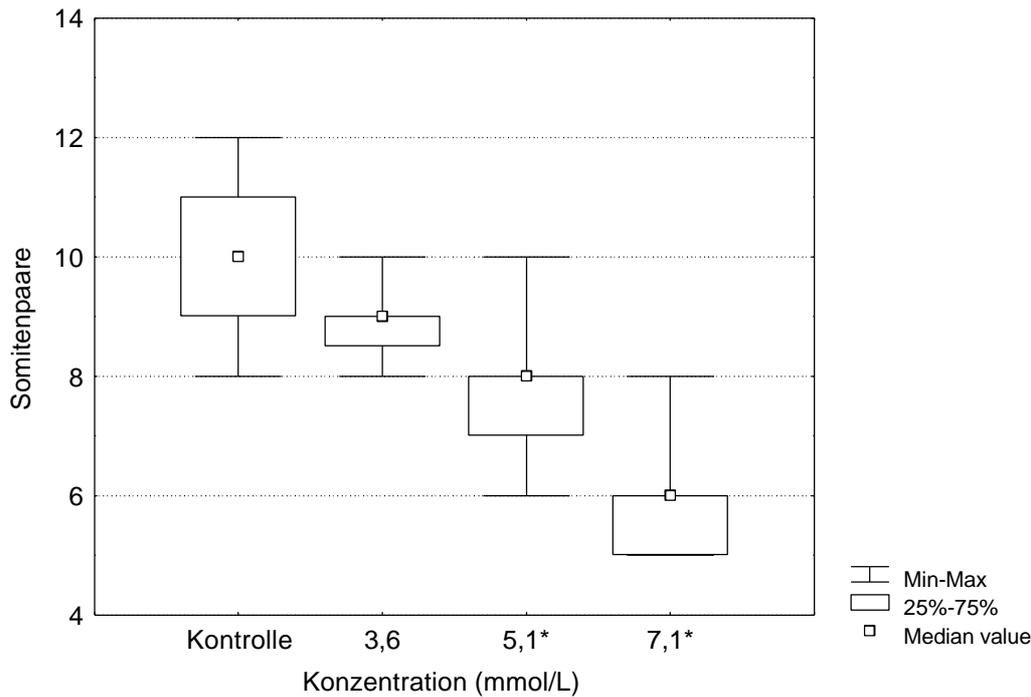


Abb. 66: Wirkung von Valpromid auf die Somitenbildung

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC reduzierte Somitenanzahl: 3,6 / 5,1 mmol/L

Malformationen wurden nur in 7,1 mmol/L festgestellt. Zwei Embryonen (12,5 %) wiesen schwere Deformationen des Kopfes und des Schwanzes auf. Bei drei weiteren (18,8 %) wurden Malformationen des Schwanzes und der Schwanzspitze bzw. der Chorda im Schwanzbereich festgestellt. Zwei Embryonen (12,5 %) ließen eine Veränderung der Chordastruktur erkennen, ohne ansonsten schwerere Malformationen aufzuweisen. Bemerkenswert ist, daß bei allen in 7,1 mmol/L überlebenden Embryonen keine Sacculi nachgewiesen werden konnten. Für die teratogenen Effekte wurde durch Bildung des geometrischen Mittelwertes aus 5,1 und 7,1 mmol/L eine EC_{50} (48 h) von 6,0 mmol/L errechnet.

Da es einen Hinweis auf Reduktion des Längenwachstums gab, wurden die Embryonen nach 48 Stunden in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. In Tab. 130 sind die Effekte aufgeführt.

Tab. 130: Zusammenstellung der Effekte von Valpromid auf die Larvalentwicklung von *D. rerio* nach 120 Stunden

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (mmol/L)					
		Kontrolle	3,6	5,1	7,1	10,0	14,0
koaguliert ^a	120	–	–	–	12	20	20
Dotteroedem	120	–	2	3	–	†	†
Perikardoedem	120	–	2	3	5/8	†	†
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	120	–	–	–	3/8	†	†
deformierte Schwanzspitze	120	–	–	–	1/8	†	†
Säbelschwanz	120	–	–	2	2/8	†	†
Augendeformation	120	0	0	2	5/8	†	†
Σ teratogen		0	0	4	6/8	†	†
Σ subletal		0	2	6	7/8	†	†

Anzahl der Larven je „Konzentration“ n = 20. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten; a : koaguliert und nicht geschlüpft Embryonen zusammengefaßt

In der mittleren Konzentration erhöhte sich der Anteil der toten Embryonen auf 60 %. Die nicht geschlüpften Embryonen wurden als tot gewertet, da sie sich bereits in Lyse befanden. Die LC₅₀ (120 h) beträgt 7,1 mmol/L ($R^2 = 0,998$; b = 25,6; LC₁₀ = 6,3 mmol/L) und liegt damit 10 % unter der LC₅₀ (48 h). Durch die Verlängerung der Testdauer ergab sich für Valpromid nach Beendigung der Exposition ein Hinweis auf verzögert einsetzende letale Effekte.

Ein konzentrationsabhängiges Auftreten von Oedemen wurde ebenso beobachtet, wie verschiedene Malformationen im Schwanzbereich. Interessanterweise wurden in 5,1 und 7,1 mmol/L bei 10 % bzw. 62,5 % der Larven Augendeformationen beobachtet, die nach 48 Stunden nicht festgestellt wurden. Für die teratogenen Effekte nach 120 Stunden läßt sich eine EC₅₀ von 6,2 mmol/L berechnen ($R^2 = 0,971$; b = 15,1; EC₁₀ = 5,1 mmol/L). Diese unterscheidet sich wenig von der EC₅₀ teratogen nach 48 Stunden, ergibt sich aber qualitativ aus zum Teil anderen Effekten.

In Abb. 67 ist die Schwanzlänge der Larven nach 120 Stunden dargestellt. Bereits in der geringsten untersuchten Konzentration war die Schwanzlänge der Larven nach 120 Stunden im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert (p = 0,05). Die Larven in 7,1 mmol/L gingen in diese Betrachtung nicht mit ein, weil nur eine einzige Larve keine subletalen Effekte aufwies. Bei den anderen konnten durch die ausgeprägten Malformationen und Oedeme die Schwanzlängen nicht bzw. nicht fehlerfrei gemessen werden.

In Tab. 131 sind die berechneten LC₅₀, EC₅₀ und NOEC / LOEC zusammengestellt.

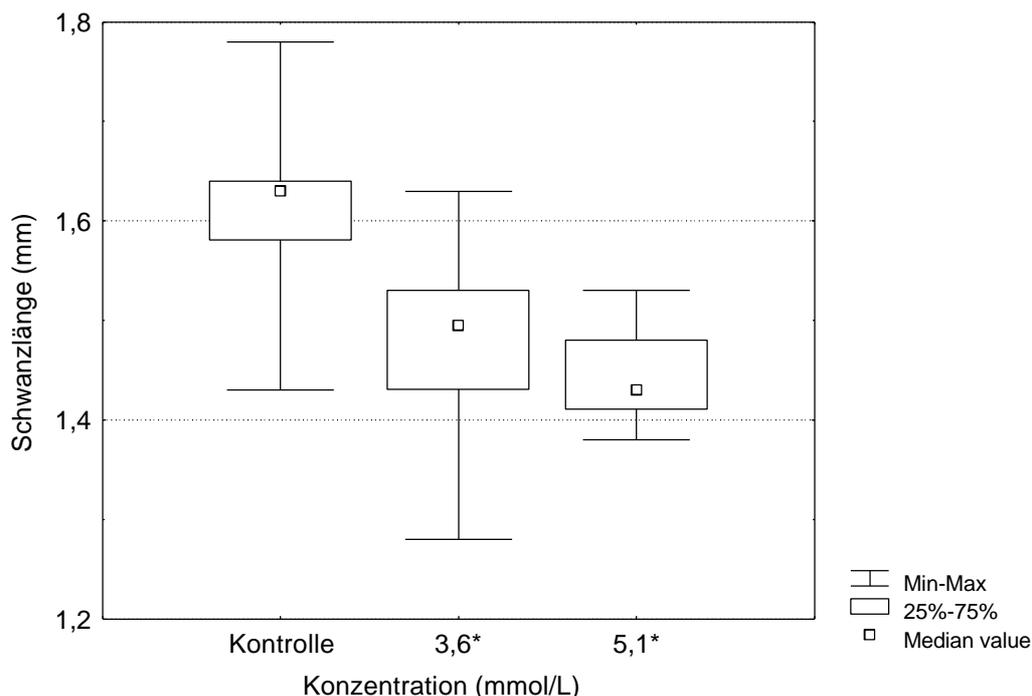


Abb. 67: Wirkung von Valpromid auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC_{reduzierte Schwanzlänge}: - / 3,6 mmol/L

Tab. 131: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Valpromid

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	7,9 (7,4 – 8,4)
LC ₅₀	120	7,1 (6,7 – 7,4)
EC ₅₀ Entwicklungsverzögerung	24	5,7 (5,4 – 6,1)
EC ₅₀ Blutkreislauf	48	3,7 (3,4 – 4,1)
EC ₅₀ subletal	48	2,8 (1,8 – 4,3)
EC ₅₀ teratogen	48	6,0
EC ₅₀ teratogen	120	6,2 (5,6 – 6,9)
NOEC / LOEC _{reduzierte Somitenanzahl}	16	3,6 / 5,1
NOEC / LOEC _{reduzierte Schwanzlänge}	120	- / 3,6
TI		1,32

Aufgrund der Berechnungsmethoden für die LC₅₀ und die EC₅₀ teratogen nach 48 Stunden ist es nicht möglich, den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen mittels Sigmoiden zu verdeutlichen. Da teratogene Effekte in einer Konzentration auftraten, in der 20 % der Embryonen tot waren, kommt es vermutlich zu einer Überschneidung beider Bereiche. Für den Teratogenitätsindex TI wurde ein Wert von 1,32 berechnet. Einen empfindlichen Endpunkt stellt die Reduktion des Längenwachstums dar. Die LOEC_{reduzierte Schwanzlänge} beträgt 3,6 mmol/L.

Valpromid ließ im *DarT* ein teratogenes Potential erkennen. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.23.4 (Seite 179) dargestellt.

3.23.3 Isobutyl-ethyl-Valpronsäure

Vorversuche mit Isobutyl-ethyl-Valpronsäure (nachfolgend als Isobutyl-ethyl-VPA bezeichnet) ergaben ein starkes Absinken der pH-Werte unter den Grenzwert von 4,5. Die exponierten Embryonen starben innerhalb von zwölf Stunden ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in allen Untersuchungen der pH-Wert zu Versuchsbeginn mittels NaOH (0,1 mol/L) auf neutrale Werte eingestellt. Wenn es sich bei Isobutyl-ethyl-VPA um eine schwache Säure handelt (pK_S-Wert liegt nicht vor – Nau, persönliche Mitteilung, 2002), dann hätte diese Maßnahme einen Einfluß auf die Bioverfügbarkeit. Entsprechend der Gleichung von Henderson-Hasselbalch und in Abhängigkeit vom pK_S-Wert sind für schwache Säuren die Voraussetzungen für eine Diffusion durch Membranen im sauren Milieu gegeben.

Isobutyl-ethyl-VPA wurde in den Konzentrationen 2.059, 2.885, 4.036, 5.665 und 7.926 µmol/L untersucht. Im Kontrollmedium und in den Testlösungen lagen Sauerstoffsättigung und Osmolarität in dem für den Test zulässigen Bereich. Die pH-Werte der Testlösung betragen 3,44 bis 3,83 und wurden auf neutrale Werte eingestellt. Die Meßwerte sind der Tab. A 17 (Anhang A) zu entnehmen.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tab. 132 zusammengefaßt. Der Test ist valide, da bei den Kontrollen keine Effekte auftraten. In den beiden höchsten Konzentrationen waren nach 24 Stunden bereits alle Embryonen koaguliert und in 4.036 µmol/L 45 %. In den folgenden 24 Stunden erhöhte sich in dieser Konzentration der Anteil der abgestorbenen Embryonen auf 60 %. Die LC₅₀ (48 h) beträgt 4.010 µmol/L (R² = 0,998; b = 25,4; LC₁₀ = 3.569 µmol/L).

Tab. 132: Zusammenstellung der letalen Effekte von Isobutyl-ethyl-VPA

Effekt	Zeit (h)	Konzentration (µmol/L)					
		Kontrolle	2.059	2.885	4.036	5.665	7.926
koaguliert	2,5	–	–	–	–	–	–
	24	–	–	–	9	20	20
	36	–	–	–	12	20	20
	48	–	–	–	12	20	20

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt

Die lebenden Embryonen in den drei niedrigen Konzentrationen waren durch allgemein toxische Effekte stark geschädigt. Sie wiesen Dotter- bzw. Perikardoedeme auf, hatten keinen Blutkreislauf und teilweise keinen Herzschlag. Allen Embryonen fehlten die Otolithen in den Sacculi. Bei einzelnen Embryonen wurde eine Deformation des Schwanzes bzw. der Schwanzspitze beobachtet.

Deshalb wurde ein weiterer Test mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt. In den Konzentrationen 381, 534, 749, 1.047 und 1.470 µmol/L lagen die pH-Werte zwischen 4,00 und 4,63 und wurden auch hier mittels NaOH auf einen neutralen Bereich eingestellt. Im Kontrollmedium und den Testlösungen lagen Sauerstoffsättigung und Osmolarität in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Meßwerte sind in Tab. A 17 (Anhang A) zusammengestellt.

Die von Isobutyl-ethyl-VPA verursachten subletalen Effekte sind in Tab. 133 zusammengestellt. Letale Effekte traten nicht auf. Auch bei diesem Test wiesen die Kontrollembryonen keine Effekte auf; er ist somit valide. Die ersten nennenswerten subletalen Effekte wurden nach 48 Stunden beobachtet. Vor allem in den beiden höchsten Konzentrationen kam es zu einer Beeinträchtigung des Blutkreislaufes. In 1.470 $\mu\text{mol/L}$ waren davon acht Embryonen (40 %) betroffen, in 1.047 $\mu\text{mol/L}$ drei Embryonen (15 %) und in 749 und 534 $\mu\text{mol/L}$ je ein Embryo (5 %). In allen Konzentrationen, außer der geringsten, traten vermehrt Oedeme auf. Für diese Effekte wurde eine $EC_{50 \text{ Oedeme}}$ (48 h) von 1.480 $\mu\text{mol/L}$ berechnet ($R^2 = 0,720$; $b = 2,4$; $EC_{10} = 424 \mu\text{mol/L}$). Für die Summe aller subletalen Effekte nach 48 Stunden beträgt die $EC_{50 \text{ subletal}}$ 962 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,885$; $b = 4,2$; $EC_{10} = 478 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 133: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Isobutyl-ethyl-VPA auf die Embryonalentwicklung von *D. rerio*

Effekt	Zeit (h)	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
		Kontrolle	381	534	749	1.047	1.470
diffuse Augenanlage	24	–	–	–	–	–	1
	48	–	–	–	–	–	–
schwacher bzw. unvollständiger Blutkreislauf	48	–	–	1	1	–	2
	48	–	–	–	–	3	6
Dotteroedem	48	–	–	4	4	5	12
	48	–	–	1	1	1	4
<i>Malformationen:</i>							
Chordadeformation (Schwanz)	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	–	3
Chordadeformation (Körper)	24	–	–	–	–	–	–
	48	–	–	–	–	2	3
Otolithen nicht angelegt	48	–	–	–	1	6	15
Σ teratogen		0	0	0	1	7	16
Σ subletal		0	0	4	5	9	17

Pro Konzentration wurden 20 Embryonen exponiert. – : kein Embryo zeigte diesen Effekt; † : alle Embryonen koaguliert; Σ : Anzahl der Embryonen, die nach 48 Stunden entsprechende Effekte zeigten

Deformationen der Chorda fanden sich in 1.470 $\mu\text{mol/L}$ bei sechs (30 %) und in 1.047 $\mu\text{mol/L}$ bei zwei Embryonen (10 %). Die Effekte traten nicht schon nach 24, sondern erst nach 48 Stunden auf. In den drei höchsten Konzentrationen wurden Embryonen beobachtet, bei denen die Sacculi angelegt, aber keine Otolithen ausgebildet waren. Dieser Effekt fand sich bei 15 Embryonen (75 %) in 1.470 $\mu\text{mol/L}$, bei sechs Embryonen (30 %) in 1.047 $\mu\text{mol/L}$ und bei einem Embryo (5 %) in 749 $\mu\text{mol/L}$. Die $EC_{50 \text{ teratogen}}$ (48 h) beträgt 1.167 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0,999$; $b = 8,5$; $EC_{10} = 825 \mu\text{mol/L}$).

Nach 48 Stunden lagen keine eindeutigen Hinweis auf eine mögliche Reduktion des Längenwachstums vor. Um die Daten mit der von Valproinsäure und Valpromid bekannten Reduktion des Längenwachstums zu vergleichen, wurden die Embryonen in unbelastetes Medium überführt und die Larven nach 120 Stunden untersucht. In 1.470 $\mu\text{mol/L}$ waren sieben Embryonen (35 %) nicht geschlüpft und koaguliert, in 1.047 und 381 $\mu\text{mol/L}$ je einer (5 %). Obwohl aufgrund der Datenlage keine LC_{50} (120 h) berechnet werden konnte, ergibt sich daraus ein Hinweis auf verzögert auftretende letale Effekte.

Ein Oedem wurde bei einer Larve (5 %) in 749 $\mu\text{mol/L}$ und bei zwei Larven (15,4 %) in 1.470 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet. Diesen beiden Larven fehlte zudem der Blutkreislauf, und ihr Schwanz war nach dorsal gebogen („Säbelschwanz“). Bei einer dieser Larven und einer weiteren trat eine Deformation der Chorda im Schwanzbereich auf. In Abb. 68 sind die nach 120 Stunden gemessenen Schwanzlängen der Larven dargestellt.

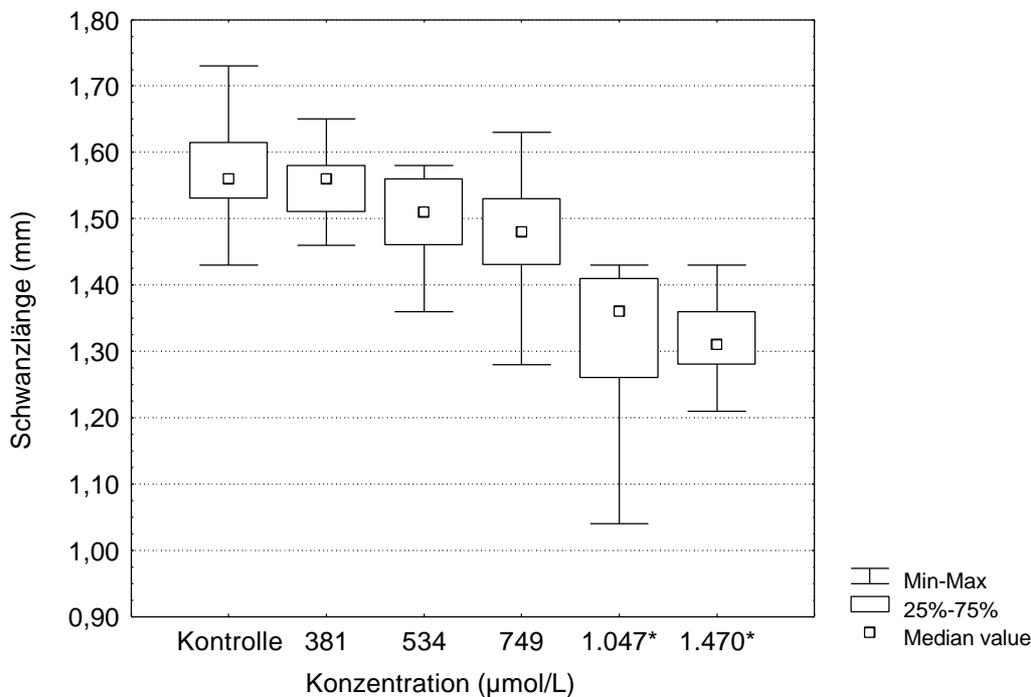


Abb. 68: Wirkung von Isobutyl-ethyl-VPA auf die Längenentwicklung des Schwanzes

* : signifikant reduziert ($p = 0,05$); NOEC / LOEC_{reduzierte Schwanzlänge}: 749 / 1.047 $\mu\text{mol/L}$

In der geringsten untersuchten Konzentration unterscheidet sich der Median nicht von dem der Kontrollen. Ab 534 $\mu\text{mol/L}$ ist eine konzentrationsabhängige Reduktion der Schwanzlänge zu erkennen. Diese ist ab 1.047 $\mu\text{mol/L}$ signifikant ($p = 0,05$). In Tab. 134 sind die berechneten EC_{50} , LC_{50} und NOEC / LOEC zusammengestellt, Abb. 69 veranschaulicht den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die letalen und die teratogenen Effekte.

Tab. 134: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Isobutyl-ethyl-VPA

	Zeit (h)	$\mu\text{mol/L}$
LC ₅₀	48	4.010 (3.810 – 4.220)
EC ₅₀ Oedeme	48	1.480 (933 – 2.349)
EC ₅₀ subletal	48	962 (815 – 1.136)
EC ₅₀ teratogen	48	1.167 (1.052 – 1.296)
NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge	120	749 / 1.047
TI		3,44

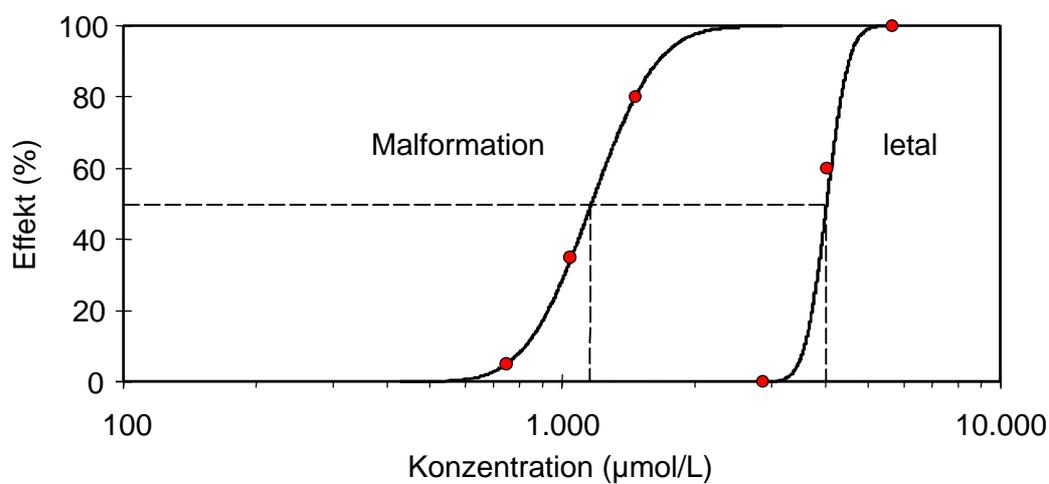


Abb. 69: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Isobutyl-ethyl-VPA für die teratogenen und letalen Effekte

LC₅₀ (48 h): 4.010 $\mu\text{mol/L}$; EC₅₀ teratogen (48 h): 1.167 $\mu\text{mol/L}$

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für die letalen Effekte verläuft sehr steil ($b = 25,4$). Obwohl die Kurve für die Malformationen durch einen bedeutend geringeren Anstieg ($b = 8,5$) gekennzeichnet ist und entsprechend flacher verläuft, sind beide Sigmoiden deutlich voneinander getrennt. Die teratogenen Effekte traten in Konzentrationen auf, die um den Faktor 3 bis 5 unterhalb der LC₅₀ lagen. Das trifft auch für die Reduktion der Schwanzlänge nach 120 Stunden zu.

Mit *DarT* wurde für Isobutyl-ethyl-VPA ein teratogenes Potential nachgewiesen. Der Teratogenitätsindex TI von 3,44 bekräftigt diese Aussage. Die Daten aus Untersuchungen mit Säugetieren sind in 3.23.4 dargestellt.

3.23.4 Valproinsäure und Strukturanaloga – zusammenfassende Betrachtung

Nach Lewis (2000) verursacht Valproinsäure teratogene Effekte sowohl beim Menschen, als auch im Tierexperiment. Dazu zählen eine anormale Entwicklung des Zentralnervensystems sowie der Augen. Ohrmißbildungen wurden bei Neugeborenen beschrieben, nachdem die Mütter während der Schwangerschaft mit Valproinsäure behandelt worden waren. Verursacht wurden ebenfalls Mißbildungen von Herz, Skelett und Gesichtsschädel sowie Spina bifida (Shepard, 1992).

Skelettmißbildungen und Gaumenspalte traten bei Maus, Ratte und Kaninchen auf (Shepard, 1992). Weiterhin wurde bei der Maus eine anormale Entwicklungen des Neuralrohres beschrieben (Trotz et al., 1987). Hendrickx et al. (1988) untersuchten die Wirkung von Valpronsäure bei Rhesusaffen. Bei oraler Applikation von 20 bis 600 mg/kg zwischen dem 20. und 50. Gestationstag traten Mißbildungen des Skelettsystems und des Gesichtsschädels auf. Finnell et al. (1997) kommen nach der Auswertung zahlreicher Studien zu dem Schluß, daß Valpronsäure vor allem Neuralrohrdefekte verursacht. Der Wirkmechanismus von Valpronsäure ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Nach Nau & Scott (1987) reichert sich die Substanz während der Phase der Neuralrohrentwicklung im Embryo an. Trotz et al. (1987) vertreten die Hypothese, daß Valpronsäure den Folsäuremetabolismus stört. Sie applizierten Mäusen zusätzlich Folsäure und reduzierten somit bei den Feten die Anzahl der durch Valpronsäure verursachten Neuralrohrdefekte. Hishida & Nau (1998) machen einen durch Valpronsäure induzierten Methioninmangel und davon ausgehende Änderungen im Glutathionmetabolismus für die Neuralrohrdefekte verantwortlich.

Valpromid verursacht im Tierversuch bei der Maus teratogene Effekte (Lewis, 2000). Nau & Scott (1986) untersuchten die Wirkung von Valpronsäure und Valpromid bei Mäusen. Die Ergebnisse sind in Tab. 135 zusammengestellt.

Tab. 135: Zusammenstellung der Effekte (%) aus Untersuchungen mit Mäusen (Nau & Scott, 1986), Dosisangaben wurden in mmol/kg umgerechnet

Effekt	Natrium-Valproat 3,61 mmol/kg	Valpromid 4,19 mmol/kg
Exenzephalie	61	1
Resorption	45	25

Trächtigen Mäusen wurden am 8. Gestationstag 3,61 mmol/kg (i.p.r.) Natrium-Valproat bzw. 4,19 mmol/kg Valpromid appliziert. Nach zehn Tagen wurden die Feten auf Exenzephalie hin untersucht. Natrium-Valproat verursachte bei 61 % der lebenden Feten Exenzephalie, wobei die Resorptionsrate 45 % betrug. Die Mißbildungsrate bei den lebenden Feten der Valpromid exponierten Tiere betrug demgegenüber nur 1 %. Die Resorptionsrate lag in diesem Fall bei 25 %. Valpromid verursachte in einer 16 % höheren Dosis bedeutend weniger embryotoxische bzw. teratogene Effekte. Die Autoren (Nau & Scott, 1986) kommen zu dem Schluß, daß Valpromid im Vergleich zur Valpronsäure ein geringeres teratogenes Potential hat.

Die im *DarT* aufgetretenen Effekte sind in Tab. 136 zusammengestellt (phänomenologisch). Valpronsäure und Valpromid verursachten bei den Embryonen von *D. rerio* vergleichbare Effekte. Betroffen waren vor allem Chorda und Schwanz sowie die Sacculi bzw. Otolithen. Eine Veränderung der Chordastruktur und die Deformation des Kopfes wurde nur bei Valpromid-exponierten Embryonen beobachtet; die Larven ließen nach 120 Stunden eine Deformation der Augen erkennen. Dagegen verursachte Valpronsäure bei einzelnen Embryonen eine Deformation des Herzens und Symptome eines Spaltembryos. Mißbildungen

des Herzens und das Auftreten von Spina bifida werden als Effekte beim Menschen beschrieben. Spina bifida-ähnliche Mißbildungen wurden ebenfalls bei Untersuchungen mit Säugetieren beobachtet.

Isobutyl-ethyl-VPA verursachte wie die beiden anderen Substanzen im *DarT* Deformationen der Chorda, Effekte an den Otolithen und die Reduktion der Schwanzlänge.

Tab. 136: Phänomenologische Zusammenfassung der im *DarT* beobachteten teratogenen Effekte

Effekt	Valpronsäure	Valpromid	Isobutyl-ethyl-VPA
Chordadeformation	●	●	●
Schwanzdeformation	●	●	
Schwanzspitze	●	●	
Chordastruktur		●	
Kopfdeformation		●	
Augendeformation ^a		●	
Herzdeformation	●		
Spaltembryo	●		
Sacculi/Otolithen	●	●	●
reduzierte Schwanzlänge	●	●	●

a : nach 120 h aufgetreten

In Tab. 137 sind die im *DarT* ermittelten Wirkkonzentrationen zusammengestellt.

Tab. 137: Zusammenstellung von EC_{50} teratogen (48 h) und $LOEC$ reduzierte Schwanzlänge (120 h)

	EC_{50} teratogen ($\mu\text{mol/L}$)	$LOEC$ reduzierte Schwanzlänge ($\mu\text{mol/L}$)
Valpronsäure	96	55
Valpromid	6.000	3.600
Isobutyl-ethyl-VPA	1.167	1.047

Für Valpronsäure liegen sowohl die EC_{50} teratogen als auch die $LOEC$ reduzierte Schwanzlänge um mehr als den Faktor 60 unter den Wirkkonzentrationen von Valpromid. Des weiteren verursachte Valpronsäure teratogene Effekte im subletalen Konzentrationsbereich, während bei Valpromid die Malformationen in einer Konzentration auftraten, in der auch 20 % letale Effekte beobachtet wurden. Valpronsäure zeigt im *DarT* ein bedeutend stärkeres teratogenes Potential als Valpromid. Die Embryonen von *D. rerio* spiegeln somit für Valpronsäure und Valpromid das aus Untersuchungen mit Säugetieren bekannte Verhältnis gut wider.

Nach Bojic et al. (1996) verursacht Isobutyl-ethyl-VPA bis 3 mmol/kg keine teratogenen Effekte bei der Maus. Eine zunehmende Verzweigung der Valpronsäureanaloge führt zur Reduktion des teratogenen Potentials der Substanz. Isobutyl-ethyl-VPA als nicht säugerteratogene Substanz stellt eine „Negativkontrolle“ dar (Ellerbeck, persönliche Mitteilung, 1998). Die im *DarT* berechneten Wirkkonzentrationen liegen zwischen denen von

Valproinsäure und Valpromid (Tab. 137). Isobutyl-ethyl-VPA verursachte teratogene Effekte im eindeutig subletalen Konzentrationsbereich. Für Isobutyl-ethyl-VPA wurde bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* ein falsch positives Ergebnis erzielt.

3.24 Erweiterung der Datenbasis nicht säugerteratogener Substanzen

Im Vergleich zu 21 säugerteratogenen Substanzen wurden nur 13 nicht säugerteratogene untersucht. Um diese Datenbasis zu erweitern, wurden vier Substanzen in die Betrachtung einbezogen, die bereits in früheren Studien im Embryotest mit *D. rerio* untersucht worden waren. In Tab. 138 sind diese aufgeführt.

Tab. 138: Substanzen ohne säugerteratogenes Potential aus früheren Studien mit Embryonen von *D. rerio*

Name	CAS	Verwendungsbeispiele	Quelle
Benzoessäure	65-85-0	Konservierungsmittel, Herstellung von Alkyd- und Epoxidharzen	Schulte, 1997
Ethylendiamin	107-15-3	Bestandteil von Pharmaka, Frostschutzmittel, Zwischenprodukt für Farb- und Klebstoffe	Bachmann, 1996
Harnstoff	57-13-6	Düngemittel, Futtermittelzusatz, Zwischenprodukt Kleb- und Kunststoffe	Lange, 1993
1-Octanol	111-87-5	Lösungsmittel	Schulte, 1997

CAS : chemical abstract service number

Nachfolgend werden die bei den Untersuchungen ermittelten Ergebnisse kurz zusammengefaßt.

3.24.1 Benzoessäure

Benzoessäure wurde in Konzentrationen von 0,13 bis 0,64 mmol/L untersucht. Benzoessäure verursachte massive Störungen der frühen Embryonalentwicklung. Nach 12 und 24 Stunden wurden Entwicklungsverzögerung und fehlende Spontanbewegung festgestellt. Nach 48 Stunden fanden sich konzentrationsabhängig Embryonen ohne Herzaktivität und vermehrt ausgebildete Oedeme. Vereinzelt traten Deformationen auf, die jedoch von den letalen Effekten überdeckt wurden. Teratogene Effekte wie Chordadeformation oder Deformation des Kopfes wurden nicht beobachtet. Die berechneten Werte sind in Tab. 139 aufgeführt.

Tab. 139: Zusammenfassung der berechneten Werte für Benzoessäure

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	0,16
EC ₅₀ Oedeme	48	0,14
EC ₅₀ Herz-Kreislauf	48	0,14

Für Benzoesäure sind keine an Säugern verursachten teratogenen Effekte bekannt (Lewis, 2000).

3.24.2 Ethylendiamin

Ethylendiamin wurde in Konzentrationen von 4,4 bis 12,5 mmol/L untersucht. Es verursachte eine Störung der frühen Phasen der Embryonalentwicklung, die zum Absterben der Embryonen führte. Nach 36stündiger Exposition war das Herz-Kreislaufsystem beeinträchtigt. Teratogene Effekte traten weder im subletalen noch im letalen Konzentrationsbereich auf. In Tab. 140 sind die berechneten Werte aufgeführt.

Tab. 140: Zusammenfassung der berechneten Werte für Ethylendiamin

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	6,6
EC ₅₀ Herz-Kreislauf	36	6,1

Für Ethylendiamin sind keine am Säuger verursachten teratogenen Effekte bekannt (Lewis, 2000; Shepard, 1992)

3.24.3 Harnstoff

Harnstoff wurde in Konzentrationen von 83,2 bis 416,2 mmol/L untersucht. In der höchsten Konzentrationen traten osmotische Effekte auf, die zum Absterben der Embryonen führten. Nach 36 Stunden war konzentrationsabhängig bei Embryonen kein Blutkreislauf ausgebildet. Bis zum Meßzeitpunkt nach 48 Stunden hatten sich diese Embryonen aber normal entwickelt. Teratogene Effekte wurden weder im letalen, noch im subletalen Konzentrationsbereich beobachtet. Die berechneten Werte sind in Tab. 141 aufgeführt.

Tab. 141: Zusammenfassung der berechneten Werte für Harnstoff

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	372,3
EC ₅₀ Blutkreislauf	36	323,0

Aus Untersuchungen mit Säugetieren sind keine durch Harnstoff verursachten teratogenen Effekte bekannt (Lewis, 2000). Eine oral applizierte Dosis von 33,3 mmol/kg verursachte weder bei Ratten (Gestationstag 12) noch bei Mäusen (Gestationstag 10) eine Erhöhung der Mißbildungs- bzw. Resorptionsrate (Shepard, 1992).

3.24.4 1-Octanol

1-Octanol wurde in Konzentrationen von 0,05 bis 0,26 mmol/L untersucht. Die in den drei hohen Konzentrationen exponierten Embryonen stellten ihre Entwicklung bereits frühzeitig ein und waren nach acht Stunden koaguliert. 1-Octanol wirkte auf die frühen Differenzierungsvorgänge und beeinträchtigte den Ablauf der Gastrulation. Es traten Embryonen mit Retardierungen, Oedemen und reduziertem Herzschlag auf. Schulte (1997) erwähnt Deformationen, ohne anzugeben um welche es sich handelt. Die Daten lassen die Interpretation zu, daß es sich dabei um den nicht vollständig vom Dotter abgelösten Schwanz handelt. Dies würde auch mit den erwähnten Retardierungen übereinstimmen. Die berechneten Werte sind in Tab. 142 zusammengestellt.

Tab. 142: Zusammenfassung der berechneten Werte für 1-Octanol

	Zeit (h)	mmol/L
LC ₅₀	48	0,12
EC ₅₀ Oedeme	48	0,10
EC ₅₀ Entwicklungsverzögerung	48	0,10

Für 1-Octanol sind keine an Säugetieren verursachten teratogenen Effekte bekannt (Lewis, 2000).

Für die zusätzlich in die Auswertung aufgenommenen Substanzen Benzoesäure, Ethylendiamin, Harnstoff und 1-Octanol zeigten sich bei den Testen mit Embryonen von *D. rerio* keine teratogenen Effekte. Diese Befunde stimmen somit mit der säugertoxikologischen Einordnung überein.

4 Abschließende Betrachtung

Ziel der Arbeit war es zu klären, ob sich mit Embryonen des Zebrafisch (*D. rerio*) ein teratogenes Potential von Substanzen erkennen läßt. Dazu wurde der Embryotest nach Schulte & Nagel (1994) um teratogene Endpunkte erweitert und *DarT* als Teratogenitäts-Screening Test entwickelt. Anhand von exakt definierten toxikologischen Endpunkten werden sowohl die letalen als auch die subletalen Wirkungen von Substanzen bestimmt. Darüber hinaus werden anhand von teratogenen Endpunkten speziell Malformationen erfaßt. Der Vergleich der beobachteten Effekte und der daraus berechneten Wirkkonzentrationen gestattet eine Einschätzung des teratogenen Potentials von Substanzen.

4.1 Methodenkritik

Bei dem Teratogenitäts-Screening Test (*DarT*) handelt es sich um ein aquatisches Testsystem. Spezifische Eigenschaften der Substanzen bedingen Einschränkungen, die allgemein für aquatische Testmodelle gelten.

4.1.1 Dampfdruck

Substanzen mit sehr hohem Dampfdruck können nicht getestet werden, da sie aus dem System entweichen. Ein Beispiel hierfür ist Schwefelkohlenstoff mit einem Dampfdruck von 390 hPa bei 20°C (Rippen, 1990). Diese Substanz stand zur Auswahl, konnte aber bereits in der Testvorbereitung nicht gehandhabt werden und wurde im *DarT* nicht untersucht.

4.1.2 Wasserlöslichkeit

Eine geringe Wasserlöslichkeit schränkt die Möglichkeit ein, entsprechende Substanzen im *DarT*, wie auch in anderen aquatischen Testsystemen, zu untersuchen. Viele Bleiverbindungen sind z.B. sehr schlecht wasserlöslich und demzufolge nur begrenzt zu untersuchen. Blei(II)-acetat-Trihydrat verfügt über eine gute Wasserlöslichkeit (1,08 mol/L bei 20°C; nach Merck-Sicherheitsdatenblatt „Blei(II)-acetat-Trihydrat zur Analyse ACS“, 1997) und wurde als Prüfsubstanz im *DarT* getestet (siehe 3.2, Seite 28).

Bereits nach einer Testdauer von 2,5 Stunden war in allen Konzentrationen eine unbestimmte Substanzmenge, vermutlich Blei(II)-carbonat (PbCO_3), ausgefallen. Es können keine korrekten Konzentrationen angegeben werden, so daß die Effekte nur qualitativ zu betrachten sind. Blei(II)-acetat-Trihydrat ist ein Beispiel für eine Substanz, deren Testung im *DarT* nur eingeschränkt möglich ist. Dennoch kann durch eine qualitative Betrachtung eine Einschätzung des teratogenen Potentials der Substanz vorgenommen werden.

4.2 Vergleich der Substanzen

Nachfolgend sind die in den Untersuchungen mit *DarT* gewonnenen Ergebnisse zusammengestellt. Die ermittelten Wirkkonzentrationen und die verursachten Effekte werden miteinander verglichen. Die Möglichkeit zur Quantifizierung des teratogenen Potentials wird diskutiert.

4.2.1 Vergleich der berechneten Wirkkonzentrationen

In Tab. 143 sind für 40 der 41 Testsubstanzen die LC_{50} (48 h), $EC_{50 \text{ teratogen}}$ (48 h) und $NOEC / LOEC_{\text{reduzierte Schwanzlänge}}$ (120 h) aufgeführt. Blei(II)-acetat-Trihydrat ist nicht aufgeführt, da nur eine qualitative Einschätzung der Effekte möglich war.

Es wird deutlich, in welchem weiten Bereich die ermittelten Wirkkonzentrationen liegen. Für EM 12 und Thalidomid konnten weder LC_{50} noch $EC_{50 \text{ teratogen}}$ berechnet werden. Methylquecksilberchlorid hat mit 0,0006 mmol/L (gerundet) die geringste LC_{50} . Demgegenüber beträgt die LC_{50} für Diethylenglykol 478,7 mmol/L. Diethylenglykol stellt somit von den untersuchten Substanzen die gegenüber Embryonen von *D. rerio* am wenigsten toxische dar. Zwischen diesen beiden Werten liegt ein Faktor von ca. $8 \cdot 10^5$.

Die mit der LC_{50} ermittelten Reihenfolge der Substanzen spiegelt sich auch in der Reihenfolge der $EC_{50 \text{ teratogen}}$ wider. Eine auffällige Ausnahme findet sich bei Vitamin A-Säure. Für diese Substanz liegt die $EC_{50 \text{ teratogen}}$ noch eine Größenordnung unter der von Methylquecksilberchlorid. Weiterhin ordnet sich auch die $EC_{50 \text{ teratogen}}$ von Hydroxyharnstoff und Isoniazid nicht in die Reihenfolge der letalen Wirkkonzentrationen ein. Eine vergleichbare Übereinstimmung ergibt sich bei der Reihenfolge der Konzentrationen, die eine signifikante Reduktion der Schwanzlänge verursachen ($p = 0,05$). Ausnahmen sind hier Methoxyessigsäure und Methylcarbamoylecystein. Für beide Substanzen wurde eine stark reduzierende Wirkung auf das Längenwachstum der Embryonen nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen verschiedener Substanzen (z.B.: Glykoletherverbindungen, Methylformamide) lassen den Schluß zu, daß die Embryonen von *D. rerio* in der Lage sind, diese Stoffe in gewissem Umfang zu metabolisieren.

Tab. 143: Zusammenstellung der für die Substanzen ermittelten LC₅₀, EC₅₀ teratogen und NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge (mmol/L)

Substanz	LC ₅₀	EC ₅₀ teratogen	NOEC/LOEC reduzierte Schwanzlänge
EM 12	–	–	1,658 ^b
Thalidomid	–	–	–
Methylquecksilberchlorid ^a	0,0006	0,0001	–/0,0001
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	0,002	–	–
all-trans-Retinol ^a	0,0021	0,0018	0,0001/0,0004
Vitamin A-Säure ^a	0,0036	0,00001	–
Cycloheximid	0,0052	0,0037	0,0018/0,0036
Colcemid	0,0092	–	0,0092/–
Methoxyessigsäureisopropylester	0,076	0,036	–
1-Octanol	0,12	–	–
Valproinsäure	0,140	0,096	–/0,055
Benzoessäure	0,16	–	–
Salicylsäure ^a	0,178	–	0,151/–
Acetylsalicylsäure	0,296	0,322	0,155/0,216
Methoxyessigsäure	0,596	–	0,074/0,111
Methylcarbamoylglutathion	0,757	–	–/0,412
Methylcarbamoylcystein	1,759	0,999	–/0,168
Isobutyl-ethyl-Valproinsäure	4,010	1,167	0,749/1,047
Ethylendiamin	6,6	–	–
Butyldiglykol	7,9	–	8,1/–
Valpromid	7,9	6,0	–/3,6
3-Methyl-1-butanol	12,2	–	9,6/–
Penicillin G-Natriumsalz	15,3	–	–
Ethylacetat	21,1	23,6 ^b	–
Hydroxyharnstoff	30,4	13,9	13,8/–
2,5-Hexandion	40,9	30,0	–
Diethylenglykoldimethylether	82,4	73,8	36,6/62,2
Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat	102,1	–	102,2/–
N,N-Dimethylformamid	137,1	93,8	–
2-Propanol	168,7	127,8 ^c	101,8/–
1-Methoxy-2-propanol	181,3	159,1	93,2/130,5
Aceton	225,4	177,2	–
Ethanol	260,3	245,5	–
Isoniazid	309,1	55,9 ^b	–
2-Methoxyethanol	313,2	267,2	–/131,4
Harnstoff	372,3	–	–
N-Methylformamid	377,8	303,9	189,6/–
D-Mannitol	426,9	–	–
α-D-Glucose	427,8	340,1	–
Diethylenglykol	478,7	366,8	–

– : nicht berechnet; a : Werte gerundet; b : keine valide Berechnung; c : Wert nach 120 h

In Tab. 144 sind die im *DarT* beobachteten teratogenen Effekte bei den „säugerteratogenen“ Substanzen zusammengestellt. Die Voraussetzung für eine vergleichende qualitative und quantitative Betrachtung ist, daß die Embryonen bei allen Substanzen der gleichen Dosis exponiert waren. Da dies bei den vorliegenden Untersuchungen nicht gegeben ist, kann nur eine phänomenologische Betrachtung vorgenommen werden. Eine Applikation mittels Mikroinjektion wäre ein möglicher Lösungsansatz um Untersuchungen mit vergleichbaren Dosen durchzuführen. Dieses Verfahren eignet sich allerdings nicht für den Einsatz im Screening-Test (Igel, 2002). Die Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen ist für spezielle Fragestellungen anzuwenden, und würde im Rahmen eines Screening-Verfahrens ebenfalls einen zu großen Aufwand erfordern.

Tab. 144: Phänomenologische Zusammenfassung der teratogenen Effekte

	Chorda / Schwanz ^e	Kopf	Sacculi / Otolithen	Augen	Spaltembryo	Herz	Dotter	Schwanzlänge
Diethylenglykoldimethylether	* ●	* ●			* ●			* ●
2-Methoxyethanol	* ●				* ● ^b			* ●
Methoxyessigsäure	* ●						● ^a	* ●
MAA-isopropylester	●	● ^b	●					
N,N-Dimethylformamid	* ●	* ●	●		●			
N-Methylformamid	* ●	* ● ^b	●		●			
Methylcarbamoylglutathion	* ● ^c					● ^c	●	* ●
Methylcarbamoylcystein	●				● ^b	●	●	* ●
all-trans-Retinol	* ●		●					●
Vitamin-A-Säure	* ●							
Valpronsäure	* ●		* ●		* ●	* ●		●
Valpromid	●	●	●	● ^c				●
Acetylsalicylsäure	●		●					●
Cycloheximid	* ●	● ^c	●	● ^c				* ●
Ethanol	* ●	●	* ●		●			
Hydroxyharnstoff	* ●	●	* ●	●		* ●		
Methylquecksilberchlorid	* ●		●				● ^d	* ● ^d

● : Effekt beobachtet; a : nach 2,5 und 8 h beobachtet; b : nach 24 h beobachtet; c : nach 120 h beobachtet; d : Chorion präparativ entfernt (48 h); e : Chorda und Schwanz betreffende Deformationen zusammengefaßt; * : vergleichbare Effekte aus Untersuchungen mit Säugetieren

Bei der Betrachtung der Effekte fällt auf, daß alle 17 Substanzen Deformationen des Schwanzes bzw. der Chorda verursachten. Elf Substanzen reduzierten die Schwanzlänge. Eine Beeinflussung der Schwanzlänge durch Deformationen des Schwanzes oder der Chorda kann ausgeschlossen werden, da nur die Embryonen vermessen wurden, die keine weiteren Effekte aufwiesen. N-Methylformamid und Hydroxyharnstoff verursachten bis zur höchsten auswertbaren Konzentration keine Reduktion der Schwanzlänge. Beim Test mit Methoxyessigsäureisopropylester waren die Embryonen nach 48 Stunden so stark geschädigt, das der Versuch nicht auf 120 Stunden verlängert wurde. Bei den Testen mit N,N-Dimethylformamid, Vitamin A-Säure und Ethanol waren die Schwanzlängen nicht gemessen worden.

Effekte an den Sacculi bzw. Otolithen wurden durch elf Substanzen verursacht. Acht Substanzen riefen Effekte im Bereich des Kopfes hervor. Bis auf Diethylenglykoldimethylether finden sich bei allen auch Effekte an den Sacculi bzw. Otolithen. Offensichtlich beeinflussen die Substanzen, die Mißbildungen im Kopfbereich verursachen auch die Anlage der Sacculi und Otolithen.

Bei sieben Substanzen traten Spaltembryonen auf. Selten aufgetretene und damit vermutlich spezifischere Effekte betreffen die Augen und das Herz. Augendeformationen wurden hauptsächlich an den Larven nach 120 Stunden beobachtet (Valpromid, Cycloheximid). Auch wenn zum Teil sehr massive Verformungen des Dotters beobachtet worden waren (z.B.: Methylcarbamoylcystein), ist die Einordnung dieser Effekte schwierig, da sich der Dotter als Reservematerial im Laufe der Embryonal- und Larvalentwicklung natürlicherweise verändert. Zusammenfassend lassen sich zwei Gruppen unterschiedlicher Effekte erkennen. Zum einen finden sich häufig auftretende Effekte, die somit möglicherweise ein generelles Wirkmuster darstellen. Dazu gehören Deformationen der Chorda und des Schwanzes, Effekte im Bereich des Kopfes, einschließlich der Sacculi und Otolithen, und eine Reduktion des Längenwachstums bei Embryonen, die sonst keine weiteren Effekte aufweisen. Eine zweite Gruppe umfaßt Effekte, die selten auftreten und offensichtlich auf spezifische Wirkungen zurückzuführen sind. Dazu gehören Deformationen der Augen und des Herzens. Spaltembryonen wurden relativ häufig von unterschiedlichsten Substanzen verursacht. Aufgrund der sehr speziellen Ausprägung dieses massiven Effektes wird dieser der zweiten Gruppe zugeordnet.

Um abzuschätzen, ob die Testsubstanzen im *DarT* ein vergleichbares Effektbild verursachen wie in säugertoxikologischen Studien, sind diese in Tab. 144 durch „*“ gekennzeichnet. Da für die Untersuchungen mit Säugetieren keine homogene Datenbasis vorliegt, ist dieser Vergleich kritisch zu bewerten. Stellt man vor dem Hintergrund der genannten Einschränkungen dennoch eine phänomenologische Betrachtung an, ergeben sich zum Teil beachtliche Übereinstimmungen. Für 13 der Testsubstanzen, die im *DarT* Deformationen der Chorda und des Schwanzes verursachen, sind auch bei Säugetieren Effekte am Skelettsystem im weitesten Sinne beschrieben. Für diese Substanzen bildet *DarT* auch das allgemeine Effektmuster ab.

Diethylenglykoldimethylether, 2-Methoxyethanol und vor allem Valpronsäure verursachen bei Säugetieren Neuralrohrdefekte. Bei diesen Substanzen wurden bei Embryonen von *D. rerio* die Symptome eines Spaltembryos beobachtet. Dies zeigt, daß auch spezifischere Effekte im *DarT* abgebildet werden.

4.2.2 Quantifizieren des teratogenen Potentials

Die Berechnung eines Indexes dient zur Charakterisierung des teratogenen Potentials der Testsubstanzen. Der Teratogenitätsindex TI ist wie folgt definiert:

$$TI = \frac{LC_{50}}{EC_{50 \text{ teratogen}}}$$

Unter Umständen treten bei einem Test keine qualitativ auswertbaren Effekte auf. Eine Substanz kann zum Beispiel nur eine Reduktion der Schwanzlänge und keine grobstrukturellen Malformationen verursachen. In einem solchen Fall ist es möglich, einen Index für die Wachstumsreduzierung TI* zu berechnen:

$$TI^* = \frac{LC_{50}}{LOEC_{\text{reduzierte Schwanzlänge}}}$$

In Tab. 145 sind die Werte für TI und TI* der untersuchten Substanzen aufgeführt. Bei den säugerteratogenen Substanzen, für die im *DarT* ein teratogenes Potential erkannt wurde, liegen die TI Werte zwischen 0,92 und 362,9. Für Acetylsalicylsäure wurde ein TI von 0,92 berechnet. Ein TI < 1 deutet darauf hin, daß teratogene von letalen Effekten überdeckt werden. Acetylsalicylsäure hat allerdings einen deutlich reduzierenden Einfluß auf das Längenwachstum der Embryonen.

Bei zehn dieser Substanzen lag der TI zwischen 1,06 und 1,76. Für vier Substanzen ergab sich ein deutlich höherer Index > 2 (Vitamin A-Säure, Methylquecksilberchlorid, Hydroxyharnstoff und Methoxyessigsäureisopropylester). Für Methoxyessigsäure und Methylcarbamoylglutathion konnte aufgrund der Datenlage kein Index ermittelt werden.

Tab. 145: Zusammenfassung der kalkulierten TI- und TI*-Werte zur Abschätzung des teratogenen Potentials und Vergleich der Bewertung bei Säugetieren und *DarT*

Substanz	Säuger	<i>DarT</i>	TI	TI*
Acetylsalicylsäure	+	+	0,92	1,37
Blei(II)-acetat-Trihydrat ^a	+	+	nb	nb
Cycloheximid	+	+	1,41	1,44
Diethylenglykoldimethylether	+	+	1,12	1,32
N,N-Dimethylformamid	+	+	1,46	nb
EM 12	+	-	nb	nb
Ethanol	+	+	1,06	nb
Hydroxyharnstoff	+	+	2,19	nb
Methoxyessigsäure	+	+	nb	5,37
Methoxyessigsäureisopropylester	+	+	2,11	nb
2-Methoxyethanol	+	+	1,17	2,38
Methylcarbamoylcystein	+	+	1,76	10,5
Methylcarbamoylglutathion	+	+	nb	1,84
N-Methylformamid	+	+	1,24	nb
Methylquecksilberchlorid	+	+	4,27	4,14
all-trans-Retinol	+	+	1,18	5,55
Salicylsäure	+	-	nb	nb
Thalidomid	+	-	nb	nb
Valpromid	+	+	1,32	2,19
Valpronsäure	+	+	1,46	2,55
Vitamin A-Säure	+	+	362,90	nb
Aceton	-	+	1,27	nb
Benzoesäure	-	-	nb	nb
Butyldiglykol	-	-	nb	nb
Diethylenglykol	-	-	1,31	nb
Ethylacetat	-	-	0,89 ^b	nb
Ethylendiamin	-	-	nb	nb
α -D-Glucose	-	-	1,26	nb
Harnstoff	-	-	nb	nb
2,5-Hexandion	-	+	1,36	nb
Isobutyl-ethyl-Valpronsäure	-	+	3,44	3,83
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	-	-	nb	nb
D-Mannitol	-	-	nb	nb
1-Methoxy-2-propanol	-	+	1,14	1,39
3-Methyl-1-butanol	-	-	nb	nb
1-Octanol	-	-	nb	nb
Penicillin G-Natriumsalz	-	-	nb	nb
Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat	-	-	nb	nb
Colcemid	+ -	+ -	nb	nb
Isoniazid	+ -	+	5,53 ^b	nb
2-Propanol	+ -	+	1,12 ^c	nb

+ : teratogenes Potential; - : kein teratogenes Potential; + - : unklare Zuordnung; nb : nicht berechnet; a : nur qualitative Bewertung der Effekte; b : keine valide Berechnung; c : berechnet nach 120 h

Durch den Vergleich der LC_{50} mit einer Wirkkonzentration, die eine Reduktion des Wachstums wiedergibt, kann auf eine wachstumshemmende Wirkung einer Substanz geschlossen werden. Als möglicher Parameter bietet sich die Reduktion der Schwanzlänge an, für die eine LOEC berechnet werden kann. TI^* als Quotient von LC_{50} und $LOEC_{\text{reduzierte Schwanzlänge}}$ konnte nur bei 13 Substanzen berechnet werden. Die Werte lagen zwischen 1,32 und 10,5. Bis auf Methylquecksilberchlorid sind die TI^* -Werte in allen Fällen größer als die entsprechenden TI-Werte. Dabei ist jedoch zu beachten, daß bei dieser Substanz bereits nach 48 Stunden das Chorion mechanisch entfernt und die Schwanzlänge der Embryonen gemessen wurde. Das Längenwachstum wird in Konzentrationen reduziert, die unterhalb der $EC_{50 \text{ teratogen}}$ liegen. Die Reduktion der Schwanzlänge stellt einen sehr empfindlichen Endpunkt dar.

Es läßt sich zusammenfassen, daß die Ermittlung eines Teratogenitätsindex TI als Quotient von LC_{50} und $EC_{50 \text{ teratogen}}$ eine erste Einschätzung des teratogenen Potentials von Substanzen erlaubt. Dabei geben Werte über 2 einen deutlichen Hinweis auf ein im *DarT* erkanntes teratogenes Potential. Beispiele hierfür sind Vitamin A-Säure mit einem TI von über 360 oder Methylquecksilberchlorid mit einem TI von über 4. Für die meisten im *DarT* untersuchten teratogenen Substanzen wurden Werte zwischen 1 und 2 ermittelt. In diesem Bereich liegt auch der TI von Diethylenglykol und D-Glucose. Für beide Substanzen wurde aufgrund des Gesamtbildes der Befunde geschlossen, daß sie im *DarT* kein teratogenes Potential erkennen lassen.

Der Teratogenitätsindex als rein mathematisch berechnete „Größe“ berücksichtigt weder den Verlauf von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen noch das Verhältnis von letalen und teratogenen Effekte, wenn sie in einer Konzentration auftreten. TI und TI^* können als erste Einschätzung eines möglichen teratogenen Potentials dienen. Für die letztendliche Bewertung einer Substanz müssen jedoch die Art und Schwere der Effekte und die Verläufe der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für letale und teratogene Effekte berücksichtigt werden.

Insgesamt wurden 41 Substanzen untersucht. Davon verursachen 21 Substanzen beim Menschen bzw. bei Untersuchungen mit Säugetieren teratogene Effekte. 17 Substanzen werden als „nicht säugerteratogen“ eingestuft, und für drei Substanzen liegt keine klare Zuordnung vor. In Tab. 145 (Seite 191) sind diese zusammengestellt.

Beim Vergleich der Bewertung fällt auf, daß die im *DarT* erzielten Befunde gut mit der säugertoxikologischen Einordnung übereinstimmen. Für drei der „säugerteratogenen“ Substanzen wurde im *DarT* ein falsch negativer Befund ermittelt. Das betrifft Salicylsäure sowie Thalidomid bzw. das Thalidomid-Derivat EM 12.

Bei Thalidomid und EM 12 erklärt die ausgeprägte Speziespezifität der Substanzen diese falschen Ergebnisse. Beide sind hoch potent teratogen beim Menschen und bei nicht menschlichen Primaten, während die Ratte als ein Standard-Modellorganismus der Toxikologie keine vergleichbaren teratogenen Effekte erkennen läßt. Die mittels *DarT* erhaltenen Befunde sind somit gegenüber Primaten falsch negativ, entsprechen aber durchaus den von anderen Untersuchungen mit Säugetieren bekannten Erwartungen. Im Unterschied zu

den Befunden an verschiedenen Säugerspezies verursachte Salicylsäure an den Embryonen von *D. rerio* keine teratogenen Effekte und liefert demzufolge im *DarT* ein falsch negatives Ergebnis.

Von den 17 „nicht säugerteratogenen“ Substanzen zeigten vier bei den Untersuchungen mit Embryonen von *D. rerio* ein falsch positives Ergebnis. Das betrifft Aceton, 2,5-Hexandion, Isobutyl-ethyl-Valpronsäure und 1-Methoxy-2-propanol.

Für Colcemid, Isoniazid und 2-Propanol liegt hinsichtlich des teratogenen Potentials keine klare Einordnung bei Säugetieren vor. Die mittels *DarT* erzielten Ergebnisse für Colcemid lassen ebenfalls keine klare Einordnung zu. Für Isoniazid und 2-Propanol ergab sich im *DarT* ein teratogenes Potential.

Für fünf der 41 untersuchten Substanzen wurde im *DarT* das teratogene Potential falsch bewertet. Für vier Substanzen wurde das teratogene Potential zu hoch eingeschätzt und bei einer Substanz wurde es unterschätzt. Abb. 70 veranschaulicht diese Befunde.

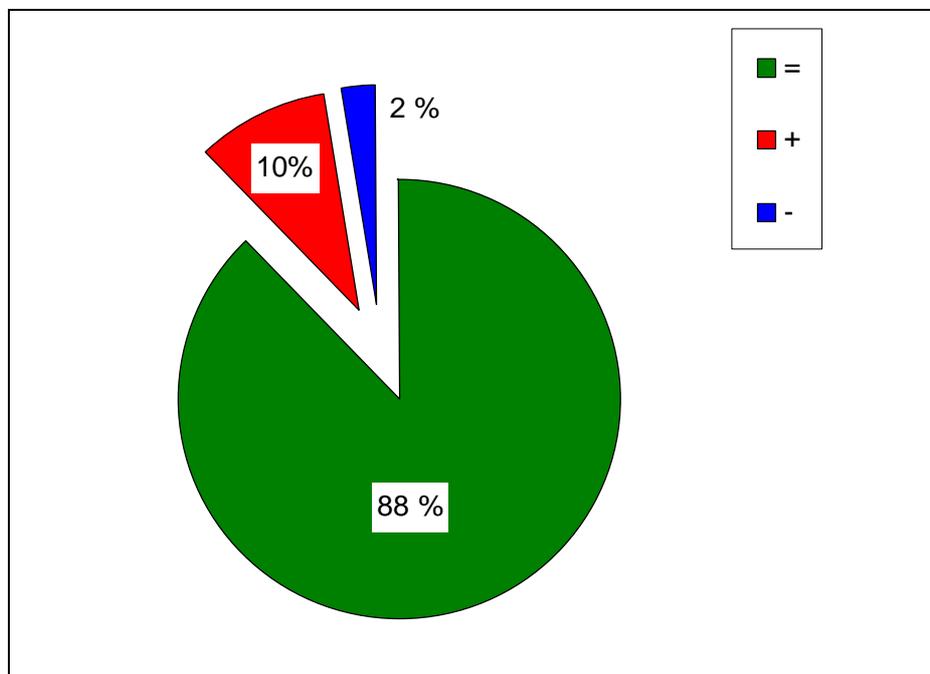


Abb. 70: Darstellung der im *DarT* erhaltenen Befunde im Vergleich zu Untersuchungen mit Säugetieren

= : Übereinstimmung *DarT*/Säuger; + : falsch positiv in *DarT*; - : falsch negativ in *DarT*

Mit dem Testsystem „*Danio rerio* Teratogenicity Assay – *DarT*“ ist ein Vergleich von Substanzen hinsichtlich ihres teratogenen und allgemein toxischen Potentials möglich. In einem Modell können Wirkkonzentrationen und Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ermittelt und direkt verglichen werden.

Die aus Untersuchungen mit Säugetieren bekannten Zuordnungen der teratogenen Potentiale von Substanzen werden gut wiedergegeben. Mit *DarT* kann eine große Anzahl von Substanzen zeit- und kostengünstig untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob sich mit den Embryonen von *Danio rerio* ein teratogenes Potential von Substanzen erkennen und quantifizieren läßt.

Der Embryotest nach Schulte & Nagel (1994) wurde modifiziert und um teratogene Endpunkte erweitert. Es wurde *DarT* („*Danio rerio* Teratogenicity Assay“) als Teratogenitäts-Screening Test entwickelt.

Embryonen von *D. rerio* wurden unter definierten Bedingungen 48 Stunden gegenüber verschiedenen Testsubstanzen exponiert. Zu bestimmten Meßzeitpunkten wurden anhand von toxikologischen Endpunkten sowohl letale als auch subletale Wirkungen von Substanzen bestimmt. Darüber hinaus wurden anhand von teratogenen Endpunkten speziell Malformationen erfaßt, wie z.B. Deformationen der Chorda, des Schwanzes sowie des Kopfbereiches. Ergaben sich im Testverlauf Hinweise auf eine Wachstumsreduzierung, wurde nach 120 Stunden als weiterer Endpunkt die Schwanzlängen der Larven bestimmt.

Der Vergleich der beobachteten Effekte und der daraus berechneten Wirkkonzentrationen erlaubt eine Einschätzung des teratogenen Potentials von Substanzen. Die im *DarT* erzielten Ergebnisse wurden mit der bekannten Zuordnung des „säugerteratogenen“ Potentials verglichen.

Zur Quantifizierung eines teratogenen Potentials kann die Berechnung eines Index beitragen. Der Teratogenitätsindex TI wurde als Quotient aus LC_{50} und $EC_{50 \text{ teratogen}}$ definiert. Durch den Vergleich der LC_{50} mit einer Wirkkonzentration, die eine Reduktion des Wachstums wiedergibt, kann auf eine wachstumshemmende Wirkung einer Substanz geschlossen werden. Dafür wurde der TI^* als Quotient aus LC_{50} und $LOEC_{\text{reduzierte Schwanzlänge}}$ berechnet.

Der Vergleich der im *DarT* ermittelten TI-Werte führt zu dem Schluß, daß dieser Index eine erste Einschätzung des teratogenen Potentials von Substanzen erlaubt. TI-Werte über 2, wie z.B. für Methylquecksilberchlorid oder Vitamin A-Säure, liefern einen deutlichen Hinweis auf ein im *DarT* erkanntes teratogenes Potential. Für eine letztendliche Bewertung ist es jedoch notwendig, die Art und Schwere der Effekte sowie die Verläufe der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für letale und teratogene Effekte zu berücksichtigen.

TI^* konnte nur für 13 Substanzen berechnet werden. Bei zwölf Substanzen war er jedoch größer als der entsprechende TI-Wert. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß das Längenwachstum in Konzentrationen reduziert wurde, die unterhalb der $EC_{50 \text{ teratogen}}$ lagen. Die Reduktion der Schwanzlänge stellt somit einen sehr empfindlichen Endpunkt dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden 21 Substanzen getestet, die beim Menschen bzw. bei Untersuchungen mit Säugetieren teratogene Effekte verursachen. Weitere 17 Stoffe sind als „nicht säugerteratogen“ eingestuft. Eine dritte Gruppe umfaßt drei Substanzen, für die hinsichtlich der Teratogenität keine klare Zuordnung vorliegt. Für 88 % der getesteten Substanzen gibt *DarT* die aus säugertoxikologischen Untersuchungen bekannten Einordnungen hinsichtlich des teratogenen Potentials wieder. Für 10 % der Testsubstanzen wurde das teratogene Potential zu hoch, für 2 % zu niedrig eingeschätzt.

Die im *DarT* beobachteten Effekte lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Häufig aufgetretene Effekte beinhalten Deformationen der Chorda, des Schwanzes und des Kopfbereiches sowie die Reduktion des Längenwachstums. Sie stellen somit möglicherweise ein generelles Wirkmuster dar.

Deformationen der Augen und des Herzens sowie Spaltembryonen traten seltener auf und sind offensichtlich auf spezifischere Wirkungen zurückzuführen.

Bei einem phänomenologischen Vergleich von Effekten aus *DarT* und Untersuchungen mit Säugetieren zeigt sich, daß *DarT* auch allgemeine Effektmuster abbildet. So wurden für 13 Testsubstanzen, die bei Säugetieren Effekte am Skelettsystem im weitesten Sinne hervorrufen, im *DarT* Deformationen der Chorda und des Schwanzes gefunden.

Andererseits werden auch spezifischere Effekte abgebildet. Beispielsweise verursacht Valpronsäure bei Säugetieren Neuralrohrdefekte, bei Embryonen von *D. rerio* Symptome eines Spaltembryos.

Mit dem Testsystem „*Danio rerio* Teratogenicity Assay – *DarT*“ ist ein Vergleich von Substanzen hinsichtlich ihres teratogenen und allgemein toxischen Potentials möglich. In einem Modell können Wirkkonzentrationen und Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ermittelt und direkt verglichen werden.

Mit *DarT* kann eine große Anzahl von Substanzen zeit- und kostengünstig untersucht werden. Die aus Untersuchungen mit Säugetieren bekannten Zuordnungen der teratogenen Potentiale von Substanzen wird gut wiedergegeben.

6 Abkürzungsverzeichnis

CAS	Chemical Abstract Service (-Number)
<i>DarT</i>	<i>D. rerio</i> Teratogenicity Assay
DMSO	Dimethylsulfoxid, zur Analyse, CAS: 67-68-5, Merck Darmstadt, Deutschland
EC ₅₀	effective (effect) concentration (50 %)
ED ₅₀	effective (effect) dose (50 %)
FAS	Fetales Alkoholsyndrom
FETAX	Frog Embryo Teratogenesis Assay - <i>Xenopus</i>
ihl.	inhalativ
ipr.	intraperitoneal
iv.	intravenös
LC ₅₀	lethal concentration (50 %)
LD ₅₀	lethal dose (50 %)
LOEC	lowest observed effect concentration
MS 222	3-Aminobenzoessäureethylester Methansulfonat, 98 %, CAS: 886-86-2, Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, USA)
NaOH	Natriumhydroxid, zur Analyse, CAS: 1310-73-2, Merck Darmstadt, Deutschland
NOEC	no observed effect concentration
ppm	parts per million
Q _{0,25}	unteres Quartil
Q _{0,75}	oberes Quartil
R ²	Korrelationskoeffizient
s	Standardabweichung
scu.	subcutan
TCLo	„Toxic Concentration Low“; geringste Konzentration, die inhalativ verabreicht in einer bestimmten Zeitspanne einen bestimmten Effekt beim Menschen oder Versuchstier verursacht
TDLo	„Toxic Dose Low“; geringste Dosis, die in einer bestimmten Zeitspanne einen bestimmten Effekt beim Menschen oder Versuchstier verursacht
TI	Teratogenitätsindex
x	Mittelwert
Z	Median
ZNS	Zentralnervensystem

in Abbildungen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

25 %-75 %	Bereich zwischen unterem und oberem Quartil
Median value	Median
Min-Max	Bereich der Minimal- und Maximalwerte

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ausgewählte Stadien der Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	12
Abb. 2: Verzögerte Schwanzablösung vom Dotter.....	17
Abb. 3: Chorda- und Schwanzdeformation.....	17
Abb. 4: Spaltembryo und Herzdeformation.....	18
Abb. 5: Larven nach 120 Stunden.....	18
Abb. 6: Darstellung einer 120 h alten Larve.....	20
Abb. 7: Wirkung von Aceton auf die Herzschlagfrequenz.....	26
Abb. 8: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Aceton für die teratogenen und die letalen Effekte.....	27
Abb. 9: Wirkung von Colcemid auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	32
Abb. 10: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Colcemid für die letalen und teratogenen* Effekte.....	33
Abb. 11: Beispiele für Effekte an Cycloheximid-exponierten Embryonen.....	35
Abb. 12: Wirkung von Cycloheximid auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	38
Abb. 13: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Cycloheximid für die teratogenen und die letalen Effekte..	39
Abb. 14: Wirkung von Ethanol auf die Herzschlagfrequenz.....	42
Abb. 15: Embryo nach 24stündiger Exposition in 293,1 mmol/L Ethanol.....	43
Abb. 16: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Ethanol für die teratogenen und die letalen Effekte.....	44
Abb. 17: Wirkung von a-D-Glucose auf die Herzschlagfrequenz.....	51
Abb. 18: Embryo nach 2,5stündiger Exposition in 634,1 mmol/L a-D-Glucose.....	52
Abb. 19: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von a-D-Glucose für die teratogenen und letalen Effekte.....	52
Abb. 20: Wirkung von Diethylenglykoldimethylether auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	55
Abb. 21: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Diethylenglykoldimethylether für die teratogenen und letalen Effekte.....	56
Abb. 22: Wirkung von 2-Methoxyethanol auf die Herzschlagfrequenz.....	59
Abb. 23: Wirkung von 2-Methoxyethanol auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	60
Abb. 24: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von 2-Methoxyethanol für die teratogenen und die letalen Effekte.....	61
Abb. 25: Wirkung von Methoxyessigsäure auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	64
Abb. 26: Metabolismus von Diethylenglykol und 2-Methoxyethanol bei Ratte und Maus.....	68
Abb. 27: Wirkung von Butyldiglykol auf die Herzschlagfrequenz.....	72
Abb. 28: Wirkung von Butyldiglykol auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	74
Abb. 29: Wirkung von Diethylenglykol auf die Herzschlagfrequenz.....	77
Abb. 30: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Diethylenglykol für die teratogenen und letalen Effekte.	78
Abb. 31: Wirkung von 1-Methoxy-2-propanol auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	82
Abb. 32: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von 1-Methoxy-2-propanol für die teratogenen und letalen Effekte.....	83
Abb. 33: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von 2,5-Hexandion für die teratogenen Effekte und Lage der letalen Effekte.....	86
Abb. 34: Embryo nach 48stündiger Exposition in 20,7 mmol/L Hydroxyharnstoff.....	89
Abb. 35: Wirkung von Hydroxyharnstoff auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	90
Abb. 36: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Hydroxyharnstoff für die teratogenen und letalen Effekte.....	91
Abb. 37: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Isoniazid für die letalen Effekte und Lage der teratogenen Effekte.....	95
Abb. 38: Wirkung von Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat auf die Herzschlagfrequenz.....	98
Abb. 39: Wirkung von 3-Methyl-1-butanol auf die Herzschlagfrequenz.....	103
Abb. 40: Wirkung von 3-Methyl-1-butanol auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	105
Abb. 41: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von 3-Methyl-1-butanol für die letalen Effekte und Lage der teratogenen Effekte.....	106

Abb. 42: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von N,N-Dimethylformamid für die teratogene und letalen Effekte	109
Abb. 43: Wirkung von N-Methylformamid auf die Längenentwicklung des Schwanzes	113
Abb. 44: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von N-Methylformamid für die teratogenen und die letalen Effekte	114
Abb. 45: Wirkung von Methylcarbamoylecystein auf die Herzschlagfrequenz	117
Abb. 46: Embryo nach 48stündiger Exposition in 859 µmol/L Methylcarbamoylecystein	118
Abb. 47: Wirkung von Methylcarbamoylecystein auf die Längenentwicklung des Schwanzes	118
Abb. 48: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Methylcarbamoylecystein für die teratogenen und die letalen Effekte	119
Abb. 49: Wirkung von Methylcarbamoylecystein auf die Herzschlagfrequenz	122
Abb. 50: Wirkung von Methylcarbamoylecystein auf die Längenentwicklung des Schwanzes	123
Abb. 51: Wirkung von Methylquecksilberchlorid auf die Herzschlagfrequenz	128
Abb. 52: Wirkung von Methylquecksilberchlorid auf die Längenentwicklung des Schwanzes nach 48 Stunden	130
Abb. 53: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Methylquecksilberchlorid für die teratogenen und letalen Effekte	131
Abb. 54: Wirkung von Penicillin G-Natriumsalz auf die Herzschlagfrequenz.....	134
Abb. 55: Wirkung von 2-Propanol auf die Herzschlagfrequenz.....	138
Abb. 56: Wirkung von 2-Propanol auf die Längenentwicklung des Schwanzes	140
Abb. 57: Wirkung von all-trans-Retinol auf die Längenentwicklung des Schwanzes	144
Abb. 58: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Vitamin A-Säure für die teratogenen und die letalen Effekte	147
Abb. 59: Wirkung von Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat auf die Herzschlagfrequenz	151
Abb. 60: Wirkung von Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	152
Abb. 61: Wirkung von Acetylsalicylsäure auf die Längenentwicklung des Schwanzes	155
Abb. 62: Wirkung von Salicylsäure auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	159
Abb. 63: Wirkung von EM 12 auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	165
Abb. 64: Wirkung von Valproinsäure auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	169
Abb. 65: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Valproinsäure für die teratogenen und die letalen Effekte	170
Abb. 66: Wirkung von Valpromid auf die Somitenbildung	173
Abb. 67: Wirkung von Valpromid auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	175
Abb. 68: Wirkung von Isobutyl-ethyl-VPA auf die Längenentwicklung des Schwanzes.....	178
Abb. 69: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Isobutyl-ethyl-VPA für die teratogenen und letalen Effekte	179
Abb. 70: Darstellung der im DarT erhaltenen Befunde im Vergleich zu Untersuchungen mit Säugetieren	193

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Teratogene Testsubstanzen	4
Tab. 2: Testsubstanzen ohne teratogenes Potential.....	7
Tab. 3: Testsubstanzen ohne klare Zuordnung.....	9
Tab. 4: Allgemein toxikologische Endpunkte	16
Tab. 5: Teratogene Endpunkte	16
Tab. 6: Zusammenstellung der letalen Effekte von Aceton	23
Tab. 7: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Aceton auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	24
Tab. 8: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Aceton	27
Tab. 9: Zusammenstellung der letalen Effekte von Blei(II)-acetat-Trihydrat (qualitative Betrachtung).....	28
Tab. 10: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Blei(II)-acetat-Trihydrat (qualitative Betrachtung)	29
Tab. 11: Zusammenstellung der letalen Effekte von Colcemid.....	30
Tab. 12: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Colcemid auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	31
Tab. 13: Zusammenstellung der Effekte von Colcemid auf die Larvalentwicklung von <i>D. rerio</i> nach 120 h	32
Tab. 14: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Colcemid	33
Tab. 15: Zusammenstellung der letalen Effekte von Cycloheximid	34
Tab. 16: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Cycloheximid auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	36
Tab. 17: Zusammenstellung der Effekte von Cycloheximid auf die Larvalentwicklung von <i>D. rerio</i> nach 120 h	37
Tab. 18: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Cycloheximid.....	38
Tab. 19: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ethanol.....	40
Tab. 20: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ethanol auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	41
Tab. 21: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Ethanol	43
Tab. 22: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ethylacetat	45
Tab. 23: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ethylacetat auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	47
Tab. 24: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Ethylacetat	48
Tab. 25: Zusammenstellung der letalen Effekte von α -D-Glucose	49
Tab. 26: Zusammenstellung der subletalen Effekte von α -D-Glucose auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	50
Tab. 27: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für α -D-Glucose.....	52
Tab. 28: Zusammenstellung der letalen Effekte von Diethylenglykoldimethylether	54
Tab. 29: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Diethylenglykoldimethylether auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	54
Tab. 30: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Diethylenglykoldimethylether	56
Tab. 31: Zusammenstellung der letalen Effekte von 2-Methoxyethanol.....	57
Tab. 32: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 2-Methoxyethanol auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	58
Tab. 33: Zusammenstellung der Effekte von 2-Methoxyethanol auf die Larvalentwicklung von <i>D. rerio</i> nach 120 h.....	60
Tab. 34: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 2-Methoxyethanol	61
Tab. 35: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methoxyessigsäure	62
Tab. 36: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methoxyessigsäure auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	63
Tab. 37: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methoxyessigsäure.....	64
Tab. 38: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methoxyessigsäureisopropylester	65
Tab. 39: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methoxyessigsäureisopropylester auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	66

Tab. 40: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methoxyessigsäure-isopropylester	67
Tab. 41: Phänomenologische Zusammenfassung der im DarT beobachteten teratogenen Effekte	69
Tab. 42: Zusammenstellung von EC ₅₀ teratogen (48 h) und LOEC reduzierte Schwanzlänge (120 h).....	70
Tab. 43: Zusammenstellung aufgetretener Effekte (%) in Untersuchungen mit der Maus bei oraler Applikation unterschiedlicher Dosen	71
Tab. 44: Zusammenstellung der letalen Effekte von Butyldiglykol.....	72
Tab. 45: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Butyldiglykol auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	73
Tab. 46: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Butyldiglykol	74
Tab. 47: Zusammenstellung der letalen Effekte von Diethylenglykol	75
Tab. 48: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Diethylenglykol auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	76
Tab. 49: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Diethylenglykol.....	78
Tab. 50: Zusammenstellung der letalen Effekte von 1-Methoxy-2-propanol	79
Tab. 51: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 1-Methoxy-2-propanol auf die Embryonalentwicklung von D. rerio.....	80
Tab. 52: Zusammenstellung der Effekte von 1-Methoxy-2-propanol auf die Larvalentwicklung von D. rerio nach 120 Stunden	81
Tab. 53: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 1-Methoxy-2-propanol ..	82
Tab. 54: Zusammenstellung der letalen Effekte von 2,5-Hexandion	84
Tab. 55: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 2,5-Hexandion auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	85
Tab. 56: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 2,5-Hexandion	86
Tab. 57: Zusammenstellung der letalen Effekte von Hydroxyharnstoff.....	87
Tab. 58: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Hydroxyharnstoff auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	88
Tab. 59: Zusammenstellung der Effekte von Hydroxyharnstoff auf die Larvalentwicklung von D. rerio nach 120 Stunden	90
Tab. 60: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Hydroxyharnstoff.....	91
Tab. 61: Zusammenstellung der letalen Effekte von Isoniazid.....	92
Tab. 62: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Isoniazid auf die Embryonalentwicklung von D. rerio .	94
Tab. 63: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Isoniazid	95
Tab. 64: Zusammenstellung der letalen Effekte von Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat.....	96
Tab. 65: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat auf die Embryonalentwicklung von D. rerio.....	97
Tab. 66: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	98
Tab. 67: Zusammenstellung der letalen Effekte von D-Mannitol.....	99
Tab. 68: Zusammenstellung der subletalen Effekte von D-Mannitol auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	100
Tab. 69: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für D-Mannitol	101
Tab. 70: Zusammenstellung der letalen Effekte von 3-Methyl-1-butanol.....	101
Tab. 71: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 3-Methyl-1-butanol auf die Embryonalentwicklung von D. rerio.....	102
Tab. 72: Zusammenstellung der Effekte von 3-Methyl-1-butanol auf die Larvalentwicklung von D. rerio nach 120 Stunden	104
Tab. 73: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 3-Methyl-1-butanol	105
Tab. 74: Zusammenstellung der letalen Effekte von N,N-Dimethylformamid.....	107
Tab. 75: Zusammenstellung der subletalen Effekte von N,N-Dimethylformamid auf die Embryonalentwicklung von D. rerio.....	108

Tab. 76: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für N,N-Dimethylformamid	109
Tab. 77: Zusammenstellung der letalen Effekte von N-Methylformamid.....	110
Tab. 78: Zusammenstellung der subletalen Effekte von N-Methylformamid auf die Embryonalentwicklung von D. rerio.....	111
Tab. 79: Zusammenstellung der Effekte von N-Methylformamid auf die Larvalentwicklung von D. rerio nach 120 Stunden	112
Tab. 80: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für N-Methylformamid	113
Tab. 81: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methylcarbamoylcystein	115
Tab. 82: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methylcarbamoylcystein auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	116
Tab. 83: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methylcarbamoylcystein	119
Tab. 84: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methylcarbamoylglutathion	120
Tab. 85: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methylcarbamoylglutathion auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	121
Tab. 86: Zusammenstellung der Effekte von Methylcarbamoylglutathion auf die Larvalentwicklung von D. rerio nach 120 Stunden	122
Tab. 87: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methylcarbamoylglutathion	124
Tab. 88: Vergleich der geringsten wirksamen Konzentration bei Untersuchungen mit der Ratte und im „Mouse Limb Bud Assay“	125
Tab. 89: Phänomenologische Zusammenfassung der im DarT beobachteten teratogenen Effekte.....	126
Tab. 90: Zusammenstellung von EC ₅₀ teratogen (48 h) und LOEC reduzierte Schwanzlänge (120 h).....	126
Tab. 91: Zusammenstellung der letalen Effekte von Methylquecksilberchlorid	127
Tab. 92: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Methylquecksilberchlorid auf die Embryonalentwicklung von D. rerio.....	129
Tab. 93: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Methylquecksilberchlorid	131
Tab. 94: Zusammenstellung der letalen Effekte von Penicillin G-Natriumsalz.....	133
Tab. 95: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Penicillin G-Natriumsalz auf die Embryonalentwicklung von D. rerio.....	134
Tab. 96: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Penicillin G-Natriumsalz	135
Tab. 97: Zusammenstellung der letalen Effekte von 2-Propanol.....	136
Tab. 98: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 2-Propanol auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	137
Tab. 99: Zusammenstellung der Effekte von 2-Propanol auf die Larvalentwicklung von D. rerio nach 120 Stunden	139
Tab. 100: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für 2-Propanol	141
Tab. 101: Zusammenstellung der letalen Effekte von all-trans-Retinol	142
Tab. 102: Zusammenstellung der subletalen Effekte von all-trans-Retinol auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	143
Tab. 103: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für all-trans-Retinol	144
Tab. 104: Zusammenstellung der letalen Effekte von Vitamin A-Säure.....	145
Tab. 105: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Vitamin A-Säure auf die Embryonalentwicklung von D. rerio	146
Tab. 106: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Vitamin A-Säure	147
Tab. 107: Phänomenologische Zusammenfassung der im DarT beobachteten teratogenen Effekte.....	149
Tab. 108: Zusammenstellung von EC ₅₀ teratogen (48 h) und LOEC reduzierte Schwanzlänge (120 h).....	149
Tab. 109: Zusammenstellung der letalen Effekte von Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat	150

Tab. 110: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	151
Tab. 111: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat.....	152
Tab. 112: Zusammenstellung der letalen Effekte von Acetylsalicylsäure.....	153
Tab. 113: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Acetylsalicylsäure auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	154
Tab. 114: Zusammenstellung der Effekte von Acetylsalicylsäure auf die Larvalentwicklung von <i>D. rerio</i> nach 120 Stunden	155
Tab. 115: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Acetylsalicylsäure	156
Tab. 116: Zusammenstellung der letalen Effekte von Salicylsäure	157
Tab. 117: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Salicylsäure auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	157
Tab. 118: Zusammenstellung der Effekte von Salicylsäure auf die Larvalentwicklung nach 120 h.....	158
Tab. 119: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Salicylsäure.....	159
Tab. 120: Im Test mit Thalidomid beobachtete subletale Effekte an den Embryonen von <i>D. rerio</i>	161
Tab. 121: Zusammenstellung der subletalen Effekte an EM 12-exponierten Embryonen von <i>D. rerio</i>	162
Tab. 122: Ansätze der Pulsuntersuchungen mit EM 12.....	163
Tab. 123: pH-Wert, Sauerstoffsättigung und Osmolarität von Kontrollmedium und Testlösung (1.658 µmol/L EM 12).....	163
Tab. 124: Zusammenstellung der subletalen Effekte von 1.658 µmol/L EM 12 auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	164
Tab. 125: Zusammenstellung der letalen Effekte von Valpronsäure	167
Tab. 126: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Valpronsäure auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	168
Tab. 127: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Valpronsäure.....	170
Tab. 128: Zusammenstellung der letalen Effekte von Valpromid	171
Tab. 129: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Valpromid auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	172
Tab. 130: Zusammenstellung der Effekte von Valpromid auf die Larvalentwicklung von <i>D. rerio</i> nach 120 Stunden	174
Tab. 131: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Valpromid.....	175
Tab. 132: Zusammenstellung der letalen Effekte von Isobutyl-ethyl-VPA.....	176
Tab. 133: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Isobutyl-ethyl-VPA auf die Embryonalentwicklung von <i>D. rerio</i>	177
Tab. 134: Zusammenfassung der berechneten Werte (95 %iger Vertrauensbereich) für Isobutyl-ethyl-VPA ...	179
Tab. 135: Zusammenstellung der Effekte (%) aus Untersuchungen mit Mäusen (Nau & Scott, 1986), Dosisangaben wurden in mmol/kg umgerechnet.....	180
Tab. 136: Phänomenologische Zusammenfassung der im DarT beobachteten teratogenen Effekte.....	181
Tab. 137: Zusammenstellung von EC ₅₀ teratogen (48 h) und LOEC reduzierte Schwanzlänge (120 h).....	181
Tab. 138: Substanzen ohne säugerteratogenes Potential aus früheren Studien mit Embryonen von <i>D. rerio</i>	182
Tab. 139: Zusammenfassung der berechneten Werte für Benzoesäure.....	182
Tab. 140: Zusammenfassung der berechneten Werte für Ethylendiamin.....	183
Tab. 141: Zusammenfassung der berechneten Werte für Harnstoff.....	183
Tab. 142: Zusammenfassung der berechneten Werte für 1-Octanol.....	184
Tab. 143: Zusammenstellung der für die Substanzen ermittelten LC ₅₀ , EC ₅₀ teratogen und NOEC / LOEC reduzierte Schwanzlänge (mmol/L).....	187
Tab. 144: Phänomenologische Zusammenfassung der teratogenen Effekte.....	188
Tab. 145: Zusammenfassung der kalkulierten TI- und TI*-Werte zur Abschätzung des teratogenen Potentials und Vergleich der Bewertung bei Säugetieren und DarT.....	191

9 Literatur

- Althaus, E. & Jakubith, M.**, 1994: Cancerogene, mutagene und teratogene Stoffe: Einstufungen und Grenzwerte für Deutschland, EU und USA im Vergleich. ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg.
- Amberger-Lahrman, M. & Schmähl, D.** (Hrsg.), 1993: Gifte – Geschichte der Toxikologie. Fourier Verlag, Wiesbaden.
- Bachmann, J.**, 1996: Wirkung von Chemikalien auf die Embryonalentwicklung des Zebraäbrblings (*Brachydanio rerio*). Diplomarbeit, Institut für Hydrobiologie, Technische Universität Dresden.
- Balls, M. & Clothier, R.**, 1991: Comments on the scientific validation and regulatory acceptance of *in vitro* toxicity tests. *Toxicology in Vitro*, 5, 5/6, 535-538.
- Balls, M., Reader, S., Atkinson, K., Tarrant, J. & Clothier, R.**, 1991: Non-animal alternative toxicity tests for detergents: genuine replacements or mere prescreens? *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 50, 423-433.
- Bantle, J.A.**, 1995: FETAX – a developmental toxicity assay using frog embryos. In: Rand, G.M. & Petrocelli, S.R., *Fundamentals of aquatic toxicity*. 2nd edition. 207-230. Taylor and Francis, Washington, Bristol, London.
- BASF**, 1999: Methoxyessigsäureisopropylester - internes Datenblatt, überarbeitet am 06. 01. 1999. BASF AG, Ludwigshafen.
- Baumann, M. & Sander, K.**, 1984: Bipartite axiation follows incomplete epiboly in zebrafish embryos treated with chemical teratogens. *The Journal of Experimental Zoology*, 230, 3, 363-376.
- Beams, H.W., Kessel, R.G., Shih, C.Y. & Tung, H.N.**, 1985: Scanning electron microscope studies on blastodisc formation in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 184, 41-49.
- Biesalski, H.K.**, 1989: Comparative assessment of the toxicology of vitamin A and retinoids in man. *Toxicology*, 57, 117-161.
- BMVEL, 2001**: Tierschutzbericht – 2001. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Referat Öffentlichkeitsarbeit (Hrsg.). Bonn.

- Bojic, U., Elmazar, M.M.A., Hauck, R.-S. & Nau, H.**, 1996: Further branching of Valproate-related carboxylic acids reduces the teratogenic activity, but not the anticonvulsant effect. *Chemical Research in Toxicology*, 9, 866-870.
- BUA 67**, 1992: Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.) – Stoffbericht 67, Diethylenglykoldimethylether. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- BUA 84**, 1992: Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.) – Stoffbericht 84, N,N-Dimethylformamid. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- BUA 170**, 1996: Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.) – Stoffbericht 170, Aceton. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- BUA 173**, 1996: Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.) – Stoffbericht 173, Propylenglykoldimethylether. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- BUA 198**, 1997: Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.) – Stoffbericht 198, Methylglykol. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Bus, J.J., White, E.L., Tyl, R.W. & Barrow, C.S.**, 1979: Perinatal toxicity and metabolism of n-hexane in Fischer 344 rats after inhalation exposure during gestation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 51, 295-302.
- Campbell, M.A. & Fantel, A.G.**, 1983: Teratogenicity of acetaldehyde in vitro: relevance to the fetal alcohol syndrome. *Life Sciences*, 32, 23, 2641-2647.
- Chaube, S. & Murphy, M.L.**, 1973: Protective effect of deoxycytidylic acid on hydroxyurea-induced malformations in rat. *Teratology*, 7, 79-88.
- Cheever, K.L., Richards, D.E., Weigel, W.W. & Begley, K.B.**, 1989: The role of enzyme induction on metabolite formation of Bis(2-Methoxyethyl) ether in the rat. *Toxicology and Industrial Health*, 5, 3, 601-607.
- Cheever, K.L., Richards, D.E., Weigel, W.W., Lal, J.B., Dinsmore, A.M. & Daniel, F.B.**, 1988: Metabolism of Bis(2-methoxyethyl) ether in the adult male rat: evaluation of the principal metabolite as a testicular toxicant. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 94, 150-159.

- Chernoff, G.F.**, 1977: The fetal alcohol syndrome in mice: an animal model. *Teratology*, 15, 223-230.
- Courtney, K.D. & Valerio, D.A.**, 1968: Teratology in *Macaca mulatta*. *Teratology*, 1, 163-172.
- Creech Kraft, J., Löfberg, B., Chahoud, L.I., Bochert, G. & Nau, H.**, 1989: Teratogenicity and placental transfer of all-trans-, 13-cis-, 4-oxo-all-trans- and 4-oxo-13-cis-retinoic acid after administration of a low oral dose during organogenesis in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 100, 162-176.
- Daniel, F.B., Cheever, K.L., Begley, K.B., Richards, D.E., Weigel, W.W. & Eisenmann, C.J.**, 1991: Bis(2-Methoxyethyl) ether: metabolism and embryonic disposition of a developmental toxicant in the pregnant CD-1 mouse. *Fundamental and Applied Toxicology*, 16, 567-575.
- Dooley, K. & Zon, L.I.**, 2000: Zebrafish – a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10, 252-256.
- Dumpert, K. & Zietz, E.**, 1984: Platanna (*Xenopus laevis*) as a test organism for determining the embryotoxic effects of environmental chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8, 55-74.
- Edwards, H.G. & Dow-Edwards, D.L.**, 1991: Craniofacial alterations in adult rats prenatally exposed to ethanol. *Teratology*, 44, 4, 373-378.
- Ensenbach, U.**, 1987: Kinetik, Akute Toxizität und Verteilung von Umweltchemikalien beim Ei des Zebrafisch (*Brachydanio rerio*). Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Ferm, V.H.**, 1966: Severe developmental malformations. *Archives of Pathology*, 81, 174-177.
- Finnell, R.H., Bielec, B. & Nau, H.**, 1997: Drug toxicity in embryonic development II : anticonvulsant drugs: mechanisms and pathogenesis of teratogenicity. In: Kavlock, R.J. & Daston, G.P. (eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 124, 2, 121-159. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Fogels, A. & Sprague, J.**, 1977: Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants. *Water Research*, 11, 811-817.

- Fort, D.J., Stover, E.L., Bantle, J.A. & Finch, R.A., 2000:** Evaluation of the developmental toxicity of Thalidomide using frog embryo teratogenesis assay - xenopus (FETAX): biotransformation and detoxification. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 20, 35-47.
- Görge, G. & Nagel, R., 1990:** Kinetics and metabolism of ^{14}C -lindane and ^{14}C -atrazine in early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Chemosphere*, 21,9, 1125-1137.
- Groth, G., Kronauer, K. & Freundt, K.J., 1994:** Effekts of N,N-Dimethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. *Toxicology in Vitro*, 8, 3, 401-406.
- Guest, I., Baillie, T.A. & Varma, D.R., 1992:** Toxicity of the methyl isocyanate metabolite S-(N-methylcarbamoyl) GSH on mouse embryos in culture. *Teratology*, 46, 61-67.
- Hanley, T.R., Calhoun, L.L., Yano, B.L. & Rao, K.S., 1984:** Teratologic evaluation of inhaled propylene glycol monomethyl ether in rats and rabbits. *Fundamental and Applied Toxicology*, 4, 784-794.
- Hardin, B.D. & Eisenmann, C.J., 1987:** Relative potency of four ethylene glycol ethers for induction of paw malformations in the CD-1 mouse. *Teratology*, 35, 321-328.
- Harris, S.B., Wilson, J.G. & Printz, R.H., 1972:** Embryotoxicity of methyl mercuric chloride in golden hamsters. *Teratology*, 6, 139-142.
- Hart, N.H. & Donovan, M., 1983:** Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *Journal of Experimental Zoology*, 227, 277-296.
- Hart, N. & Yu, S.-F., 1980:** Cortical granule exocytosis and cell surface reorganisation in eggs of *Brachydanio*. *Journal of Experimental Zoology*, 213, 137-159.
- Harvey, B., Kelley, N. & Ashwood-Smith, M.J., 1983:** Permeability of intact and dechorionated zebrafish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 20, 432-439.
- Heger, W., Jung, S., Martin, S., Rönnefahrt, I., Schiecke, U., Schmitz, S., Teichmann, H. & Peter, H., 1998:** Ökotoxikologische Testverfahren mit aquatischen Organismen. Texte des Umweltbundesamtes 58/98 – Chemikaliengesetz Heft 11. Umweltbundesamt (Hrsg.), Berlin.
- Hellwig, J., Merkle, J., Klimisch, H.J. & Jäckh, R., 1991:** Studies on the prenatal toxicity of n,n-dimethylformamide in mice, rats and rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 29, 3, 193-201.

- Hendrickx, A.G., Nau, H., Binkerd, P., Rowland, J.M., Rowland, J.R., Cukierski, M.J. & Cukierski, M.A.**, 1988: Valproic acid developmental toxicity and pharmacokinetics in the rhesus monkey: an interspecies comparison. *Teratology*, 38, 329-345.
- Hendrickx, A.G., Silverman, S., Pellegrini, M. & Steffek, A.J.**, 1980: Teratological and radiocephalometric analysis of craniofacial malformations induced with retinoic acid in rhesus monkeys. *Teratology*, 22, 13-22.
- Herrmann, K.**, 1993: Effects of the anticonvulsant drug valproic acid and related substances on the early development of the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Toxicology in Vitro*, 7, 41-54.
- Herrmann, K.**, 1995: Teratogenic effects of retinoic acid and related substances on the early development of the zebrafish (*Brachydanio rerio*) as assessed by a novel scoring system. *Toxicology in Vitro*, 9, 3, 267-283.
- Hisaoka, K.K. & Battle, H.I.**, 1958: The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 102, 311-328.
- Hisaoka, K.K. & Firlit, C.F.**, 1960: Further studies on the embryonic development of the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Journal of Morphology*, 107, 205-225.
- Hishida, R. & Nau, H.**, 1998: VPA-induced neural tube defects in mice. I. Altered metabolism of sulfur amino acids and glutathione. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 18, 49-61.
- HSDB**, 2001: Hazardous Substances Data Bank, TOXNET – Toxicology Data Network. U.S. National Library of Medicine. 8600 Rockville Pike, MD 20894 (<http://toxnet.nlm.nih.gov>).
- Igel, L.**, 2002: Einfluß der Applikationsart von Chemikalien auf ihre Wirkung im Embryotest (*DarT*) mit dem Zebrabärbling (*D. rerio*). Diplomarbeit, Institut für Hydrobiologie, Technische Universität Dresden.
- Johansson, N., Kihlström, J.E. & Wahlberg, A.**, 1973: Low pH values shown to affect developing fish eggs (*Brachydanio rerio*). *AMBIO*, 2, 42-43.
- Jones, R.W. & Huffman, M.N.**, 1957: Fish embryos as bio-assay material in testing chemicals for effects on cell division and differentiation. *Transactions of the American Microscopical Society*, 76, 177-183.

- Jonsson, B.G.**, 1972: Effects of Thalidomide on the embryonic development of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Acta pharmacologica et toxicologica*, 31, 27-32.
- Juhnke, I. & Lüdemann, D.**, 1978: Ergebnisse der Untersuchung von 200 chemischen Verbindungen auf akute Fischtoxizität mit den Goldorfentest. *Zeitschrift für Wasser- und Abwasserforschung*. 11, 5, 161-164.
- Kalter, H.**, 1972: Nonteratogenicity of isoniazid in mice. *Teratology*, 5, 259.
- Khera, K.S.**, 1976: Teratogenicity studies with methotrexate, aminopterin, and acetylsalicylic acid in domestic cats. *Teratology*, 14, 21-28.
- Kimmel, C.B.**, 1989: Genetics and early development of zebrafish. *Trends in Genetics*, 5, 8, 283-288.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F.**, 1995: Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203, 253-310.
- Kimmel, C.B & Law, R.D.**, 1985a: Cell lineage of zebrafish blastomeres – 1. Cleavage pattern and cytoplasmic bridges between cells. *Developmental Biology*, 107, 78-85.
- Kimmel, C.B & Law, R.D.**, 1985b: Cell lineage of zebrafish blastomeres – 2. Formation of the yolk syncytial layer. *Developmental Biology*, 108, 86-93.
- Klug, S., Creech Kraft, J.C., Wildi, E., Merker, H.J., Persaud, T.V.N., Nau, H. & Neubert, D.**, 1989: Influence of 13-cis and all-trans retinoic acid on rat embryonic development in vitro: correlation with isomerisation and drug transfer to the embryo. *Archives of Toxicology*, 63, 185-192.
- Klug, S., Merker, H.-J. & Jäckh, R.**, 1998: Potency of Monomethyl-, Dimethylformamide and some of their metabolites to induce abnormal development in a Limb Bud Organ Culture. *Toxicology in Vitro*, 12, 123-132.
- Knie, J., Hälke, A., Juhnke, I. & Schiller, W.**, 1983: Ergebnisse der Untersuchungen von chemischen Stoffen mit vier Biotests. *Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen*, 27, 3, 77-79.
- Kochhar, D.M., Penner, J.D. & Satre, M.A.**, 1988: Derivation of retinoic acid and metabolites from a teratogenic dose of retinol in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 96, 429-441.
- Köhler, W., Schachtel, G. & Voleske, P.**, 1996: *Biostatistik*, 2. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- Kroes, R., Peters, P.W.J., Berkvens, J.M., Verschuuren, H.G., de Vries, T. & van Esch, G.J.**, 1977: Long term toxicity and reproduction study with cyclamate, saccharin and cyclohexylamine. *Toxicology*, 8, 285-300.
- Laale, H.W.**, 1977: The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10, 121-173.
- Laale, H.W.**, 1980: The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes – a review. *Copeia*, 2, 210-226.
- Laale, H.W. & Lerner, W.**, 1981: Teratology and early fish development. *American Zoologist*, 21, 517-533.
- Lange, M.**, 1993: Vergleich von Embryotest und Zellkultur als mögliche Alternativen zum akuten Fischttest. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. & Nagel, R.**, 1995: Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere*, 30, 11, 2087-2102.
- Lary, J.M., Hood, R.D. & Lindahl, R.**, 1982: Interactions between cycloheximide and T-locus alleles during mouse embryogenesis. *Teratology*, 25, 345-349.
- Lewis, P.A., Klemm, D.J., Lazorchack, J.M., Norbert-King, T.J., Peltier, W.H. & Heber, M.A.**, 1994: Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, 3rd edition. Guideline for whole effluent toxicity methods. U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- Lewis, R.J.**, 2000: Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 10th edition, volume 1 – 3. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim.
- Litchfield, J. & Wilcoxon, F.**, 1949: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96, 99-113.
- Lohs, K., Elstner, P. & Stephan, U.**, 1999: Fachlexikon Toxikologie. ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg.
- Lorke, D.**, 1969: Untersuchungen von Cyclamat und Saccharin auf embryotoxische und teratogene Wirkung an der Maus. *Arzneimittel - Forschung*, 19, 6, 920-922.

- Maiwald, S.**, 1997: Wirkung von Lösungsvermittlern und lipophilen Substanzen auf die Embryonalentwicklung des Zebrafisches (*Danio rerio*). Diplomarbeit, Institut für Hydrobiologie, Technische Universität Dresden.
- Mann, H. & Whitney, D.**, 1947: On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18, 50-60.
- Marquardt, H. & Schäfer, S.G.**, 1994: Lehrbuch der Toxikologie. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- Mast, T.J. et al.**, 1988: Inhalation developmental toxicology studies: teratology study of acetone in mice and rats. DE-AC06-76RLO, National Institute of Environmental Health Sciences. National Toxicology Program. Batelle Memorial Institute
- Meinelt, T. & Stüber, A.**, 1995: Subchronic fish toxicity of copper and zinc dependent upon water hardness. *Fortschritte der Fischereiwissenschaft*, 12, 129-136.
- Merck**, 1997: The Merck Index on CD-ROM, Version 12:2. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.
- Miller, R.R.**, 1987: Metabolism and disposition of glycol ethers. *Drug Metabolism Reviews*, 18, 1, 1-22.
- Miller, R.R., Hermann, E.A., Langvardt, P.W., McKenna, M.J. & Schwetz, B.A.**, 1983: Comparative metabolism and disposition of ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 67, 229-237.
- Nagel, R.**, 1986: Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrafisch (*Brachydanio rerio*). *Journal of Applied Ichthyology*, 2, 4, 173-181.
- Nagel, R.**, 1988: Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Nagel, R.**, 1994: Complete life cycle tests with zebrafish – a critical assessment of the results. In: Müller, R. & Lloyd, R. (eds.), *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. FAO, Fishing News Books, Blackwell Science, 188-195.
- Nagel, R. & Isberner, K.**, 1998: Testing of chemicals with fish – a critical evaluation of tests with special regard to zebrafish. In: Braunbeck, T., Hinton, D.A. & Streit, B. (eds.), *Fish Ecotoxicology*, Birkhaeuser Verlag, Basel, 337-352.

- Nau, H. & Scott, W.J.**, 1986: Weak acids may act as teratogens by accumulating in the basic milieu of the early mammalian embryo. *Nature*, 323, 276-278.
- Nau, H. & Scott, W.J.**, 1987: Teratogenicity of valproic acid and related substances in the mouse: drug accumulation and pH in the embryo during organogenesis and structure-activity considerations. *Archives of Toxicology (Suppl.)*, 11, 128-139.
- Neubert, R. & Neubert, D.**, 1997: Peculiarities and possible mode of action of Thalidomide. In: Kavlock, R.J. & Daston, G.P. (eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 124/II – Drug toxicity in embryonic development, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 41 - 119.
- Newell-Morris, L., Sirianni, J.E., Shepard, T.H., Fantel, A.G. & Moffett, B.C.**, 1980: Teratogenic effects of retinoic acid in pigtail monkeys – II. craniofacial features. *Teratology*, 22, 87-101.
- Nolen, G.A., Gibson, W.B., Benedict, J.H., Briggs, D.W. & Schardein, J.L.**, 1985: Fertility and teratogenic studies of diethylene glycol monobutyl ether in rats and rabbits. *Fundamental and Applied Toxicology*, 5, 1137-1143.
- Nüsslein-Volhard, C.**, 1994: Of flies and fishes. *Science*, 266, 5185, 572-574.
- OECD**, 1998: Guideline for testing of chemicals – Fish embryo toxicity test with the zebrafish *D. rerio* (Draft).
- Parkhie, M. & Webb, M.**, 1983: Embryotoxicity and teratogenicity of thalidomide in rats. *Teratology*, 27, 327-332.
- Pereira, M. et al.**, 1987: Screening of priority chemicals for reproductive hazards: benzethonium chloride, 3-ethoxy-1-propanol, and acetone. ETOX-85-1002. Environmental Health Research and Testing Inc.
- Pfeifer, S., Pfliegel, P. & Borchert, H.-H.**, 1995: *Biopharmazie*. 3. Auflage. Ullstein/Mosby GmbH & Co. KG, Berlin, Wiesbaden.
- Price, C.J., Kimmel, C.A., George, J.D. & Marr, M.C.**, 1987: The developmental toxicity of diethylene glycol dimethyl ether in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 8, 115-126.
- Price, C.J., George, J.D., Marr, M.C., Morrissey, R.E., Schwetz, B.A. & Kimmel, C.A.**, 1988: Developmental toxicity of diethylene glycol dimethyl ether in New Zealand white rabbits. *Teratology*, 37, 483.

- Redmann, H.-J.**, 1997: Giftstoffe weltweit: Einführung in die Ökotoxikologie. S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Leipzig.
- Remane, A., Storch, V. & Welsch, U.**, 1989: Kurzes Lehrbuch der Zoologie. 6. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Rippen, G.**, 1990: Handbuch Umweltchemikalien, 3. Auflage, inkl. folgende Ergänzungslieferungen. ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg/Lech.
- Ritter, E.J., Scott, W.J., Randall, J.L. & Ritter, J.M.**, 1985: Teratogenicity of dimethoxyethyl phthalate and its metabolites methoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. *Teratology*, 32, 25-31.
- Roll, V.R. & Bär, R.**, 1967: Die teratogene Wirkung von Monomethylformamid bei trächtigen Mäuseweibchen. *Arzneimittel-Forschung*, 17, 610-614.
- Sachs, L.**, 1992: Angewandte Statistik. 7. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Sander, K. & Baumann, M.**, 1983: Auslösung von embryonalen Fehlbildungen beim Zebraärbling. *Biologie in unserer Zeit*, 13, 3, 87-94.
- Schäfers, C., Nagel, R. & Seitz, A.**, 1989: Verhalten, Reproduktion und Populationsdynamik des Zebraärblings (*Brachydanio rerio*) in einem naturnahen Laborsystem. *Fischökologie*, 1, 2, 45-59.
- Schulte, C.**, 1997: Entwicklung und Validierung einer Methode zur Ermittlung der Toxizität von Chemikalien gegenüber Embryonen von *Brachydanio rerio*. Dissertationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Schulte, C. & Nagel, R.**, 1994: Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results. *ATLA - Alternatives to Laboratory Animals*, 22, 12-19.
- Schumacher, H.J., Terapane, J., Jordan, R.L. & Wilson, J.G.**, 1972: The teratogenic activity of a thalidomide analogue, EM 12, in rabbits, rats, and monkeys. *Teratology*, 5, 233-240.
- Scott, W.J., Nau, H., Wittfoht, W. & Merker, H.-J.**, 1987: Ventral duplication of the autopod: chemical induction by methoxyacetic acid in rat embryos. *Development*, 99, 127-136.

- Scott, W.J., Fradkin, R., Wittfoht, W. & Nau, H.**, 1989: Teratologic potential of 2-methoxyethanol and transplacental distribution of its metabolite, 2-methoxyacetic acid, in non-human primates. *Teratology*, 39, 363-373.
- Scott, W.J., Ritter, E.J. & Wilson, J.G.**, 1971: DNA synthesis inhibition and cell death associated with hydroxyurea teratogenesis in rat embryos. *Developmental Biology*, 26, 306-315.
- Shepard, T.H.**, 1992: *Catalog of Teratogenic Agents*, 7th edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, London.
- Siewing, R.** (Hrsg.), 1985: *Lehrbuch der Zoologie, Band 2 – Systematik*. 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Smith, M.K., Kimmel, G.L., Kochhar, D.M., Shepard, T.H., Spielberg, S.P. & Wilson, J.G.**, 1983: A selection of candidate compounds for in vitro teratogenesis test validation. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 3, 461-480.
- Sokal, J.E. & Lessmann, E.M.**, 1960: Effects of cancer chemotherapeutic agents on the human fetus. *JAMA*, 172, 1765-1771. zitiert nach: Shepard, T.H., 1992: *Catalog of Teratogenic Agents*, 7th edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, London.
- Storch, V. & Welsch, U.**, 1991: *Systematische Zoologie*. 4. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Strehlow, D. & Gilbert, W.**, 1993: A fate map for the first cleavages of the zebrafish. *Nature*, 361, 451-453.
- Streit, B.**, 1994: *Lexikon Ökotoxikologie*, 2. Auflage. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- Stula, E.F. & Krauss, W.C.**, 1977: Embryotoxicity in rats and rabbits from cutaneous application of amide-type solvents and substituted ureas. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 41, 35-55.
- Terry, K.K., Stedman, D.B., Bolon, B. & Welsch, F.**, 1996: Effects of 2-methoxyethanol on mouse neurulation. *Teratology*, 54, 219-229.
- Thomas, R.J.**, 1968: Yolk distribution and utilization during early development of a teleost embryo (*Brachydanio rerio*). *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 19, 2, 203-215.

- Trotz, M., Wegner, C. & Nau, H.**, 1987: Valproic acid-induced neural tube defects: reduction by folinic acid in the mouse. *Life Sciences*, 41, 1, 103-110.
- Villalobos, S.A., Hamm, J.T., Teh, S.J. & Hinton, D.E.**, 2000: Thiobencarb-induced embryotoxicity in medaka (*Oryzias latipes*): stage-specific toxicity and the protective role of chorion. *Aquatic Toxicology*, 48, 309-326.
- Warkany, J. & Takacs, E.**, 1959: Experimental production of congenital malformations in rats by salicylate poisoning. *American Journal of Pathology*. 35, 315-331.
- Warner, C.W., Sadler, T.W., Shockey, J. & Smith, M.K.**, 1983: A comparison of the in vivo and in vitro response of mammalian embryos to a teratogenic insult. *Toxicology*, 28, 271-282.
- Weiss, G.** (Hrsg.), 1980: Hazardous chemicals data book – Environmental health review No. 4. Noyes Data Corp., Park Ridge, N.J., USA.
- Weiss, W.**, 1983: Zebras aus Bengalen, der Zebrabärbling, *Brachydanio rerio*. *Aquarienmagazin*, 11, 576-581.
- Welsch, F., Sleet, R.B. & Greene, J.A.**, 1987: Attenuation of 2-Methoxyethanol and Methoxyacetic acid-induced digit malformations in mice by simple physiological compounds: implications for the role of further metabolism of Methoxyacetic acid in developmental toxicity. *Journal of Biochemical Toxicology*, 2, 225-240.
- Wilson, J.G., Scott, W.J., Ritter, E.J. & Fradkin, R.**, 1975: Comparative distribution and embryotoxicity of hydroxyurea in pregnant rats and rhesus monkeys. *Teratology*, 11, 169-178.
- Wolenski, J. & Hart, N.**, 1987: Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish (*Brachydanio*) egg. *Journal of Experimental Zoology*, 243, 259-273.
- Zeller, Y.**, 1995: Einfluß von herzwirksamen Pharmaka auf die Embryonalentwicklung des Zebrabärblings, *Brachydanio rerio*, unter besonderer Berücksichtigung von cardiogenen Effekten. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Zitko, V. & Carson, W.G.**, 1976: A mechanism of the effects of water hardness on the lethality of heavy metals to fish. *Chemosphere*, 5, 299-303.

10 Anhang A

Tab. A 1: CAS-Nummer, Reinheitsgrad und Bezugsquelle der Testsubstanzen

Substanz	CAS	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
Aceton	67-64-1	p. a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acetylsalicylsäure	50-78-2	= 99 %	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
Blei(II)-acetat-Trihydrat	6080-56-4	p. a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Butyldiglykol	112-34-5	k. A. (Reinablauf)	BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland
Colcemid	477-30-5	98 %	Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, USA)
Cycloheximid	66-81-9	98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Diethylenglykol	111-46-6	99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Diethylenglykoldimethylether	111-96-6	99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
N,N-Dimethylformamid	68-12-2	99,8 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EM 12			Prof. Dr. Neubert (FU Berlin, Deutschland)
Ethanol (absolut)	64-17-5	p. a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylacetat	141-78-6	zur Spurenanalyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
α -D-Glucose	492-62-6	96 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
2,5-Hexandion	110-13-4	> 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Hydroxyharnstoff	127-07-1	= 98 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Isobutyl-ethyl-Valpronsäure		k. A.	Prof. Dr. Nau, Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland
Isoniazid	54-85-3	= 99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	7758-99-8	p. a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
D-Mannitol	69-65-8	> 99 %	Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, USA)
Methoxyessigsäure	625-45-6	98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Methoxyessigsäure-isopropylester	17640-21-0	k. A.	BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland
2-Methoxyethanol	109-86-4	> 99%	Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, USA)
1-Methoxy-2-propanol	107-98-2	98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
3-Methyl-1-butanol	123-51-3	k. A.	BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland
Methylcarbamoylcystein		k. A.	BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland
Methylcarbamoylglutathion		k. A.	BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland
N-Methylformamid	123-39-7	99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Methylquecksilberchlorid	115-09-3	99 %	Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland)
Penicillin G-Natriumsalz	69-57-8	k. A.	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
2-Propanol	67-63-0	technisches Produkt	BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland
all-trans-Retinol	68-26-8	> 98 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat	82385-42-0	99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Salicylsäure	69-72-7	p. a.	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
Thalidomid	50-35-1	k. A.	Prof. Dr. Neubert (FU Berlin, Deutschland)
Valpromid	2430-27-5	k. A.	Prof. Dr. Nau, Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland
Valpronsäure	99-66-1	= 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Vitamin A-Säure	302-79-4	98 %	Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, USA)

p. a. : pro analysi; k. A. : keine Angabe

In Tab. A 2 bis Tab. A 38 sind pH-Werte, Sauerstoffsättigung und Osmolarität der alphabetisch geordneten Testlösungen zusammengestellt.

Tab. A 2: Aceton

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	n.n.
111,9	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	110
134,3	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	133
161,8	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	161
192,8	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	188
232,4	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	227

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 3: Acetylsalicylsäure

Konzentration (μ mol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,16	6,99	97,7	n.n.
111	6,85	6,53	97,6	n.n.
155	6,15	5,69	98,2	n.n.
216	5,45	5,29	97,3	n.n.
305	4,45	5,05	97,4	n.n.
427	3,87	3,98	96,3	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 4: Blei(II)-acetat-Trihydrat

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,14	6,94	91,8	nicht bestimmt
0,1	6,20	6,29	93,6	nicht bestimmt
0,3	5,97	5,79	93,7	nicht bestimmt
1,6	5,68	5,65	93,2	nicht bestimmt
7,9	5,94	5,84	93,1	nicht bestimmt
39,5	6,07	5,99	93,5	nicht bestimmt

Tab. A 5: Butyldiglykol

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,27	6,99	95,1	n.n.
3,7	7,37	6,92	95,1	8
4,8	7,37	6,93	93,5	8
6,2	7,38	6,97	92,4	12
8,1	7,35	6,96	91,1	12
10,5	7,37	6,91	90,3	16

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 6: Colcemid

Konzentration (μ mol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,23	7,07	94,4	nicht ermittelt
3,2	7,28	7,02	94,0	nicht ermittelt
5,4	7,34	7,04	93,5	nicht ermittelt
9,2	7,39	7,06	92,8	nicht ermittelt
15,6	7,44	6,91	92,9	nicht ermittelt
26,7	7,46	6,95	91,2	nicht ermittelt

Tab. A 7: Cycloheximid

Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,20	6,86	96,3	n.n.
1,8	7,28	6,94	95,1	n.n.
3,6	7,31	7,02	94,9	n.n.
7,1	7,32	6,85	94,9	n.n.
14,2	7,32	6,80	95,0	n.n.
28,4	7,33	6,79	94,9	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 8: Diethylenglykol

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,07	6,91	94,8	n.n.
362,4	7,17	7,06	93,8	1.141
471,2	7,19	7,03	92,4	1.486
612,5	7,22	7,03	92,3	1.929
796,3	7,23	7,10	89,7	2.498
1.035,1	7,27	7,13	90,6	3.263
Kontrolle	7,30	7,12	99,8	n.n.
214,4	7,27	7,12	97,0	678
278,7	7,31	7,05	95,2	878
362,3	7,29	7,04	95,5	1.141
471,0	7,29	6,96	96,4	1.486

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 9: Diethylenglykoldimethylether

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,23	6,92	99,5	n.n.
29,8	7,37	6,93	98,5	31
41,7	7,33	6,92	98,9	47
58,4	7,30	6,87	99,2	63
81,8	7,29	6,85	99,5	86
114,5	7,29	6,75	97,7	122

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 10: N,N-Dimethylformamid

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,25	6,97	95,1	n.n.
54,7	7,26	6,86	95,9	55
71,1	7,26	6,92	96,4	71
92,5	7,29	6,90	93,7	94
120,2	7,28	6,96	94,7	122
156,3	7,24	6,90	93,5	157

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 11: EM 12

Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,36	6,94	97,7	n.n.
25,9	7,39	6,91	97,4	n.n.
51,8	7,37	6,95	96,5	n.n.
103,6	7,31	6,98	96,3	n.n.
207,3	7,34	6,95	95,3	n.n.
414,5	7,25	6,93	93,7	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 12: Ethanol

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	n.n.
141,1	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	141
169,3	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	169
204,0	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	200
243,1	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	239
293,0	zwischen 6,5 und 7,5	nicht bestimmt	> 90	290

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 13: Ethylacetat

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,31	7,14	94,9	n.n.
12,5	7,32	7,09	95,1	16
18,6	7,35	7,02	94,3	24
27,9	7,29	6,98	93,7	31
42,0	7,39	6,93	94,2	39
63,1	7,31	6,77	94,2	63

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 14: a-D-Glucose

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,23	7,02	97,6	n.n.
222,0	7,23	6,96	96,2	227
288,6	7,31	6,87	94,9	294
375,2	7,26	7,01	95,1	392
487,8	7,23	6,09	93,2	510
634,1	7,19	6,02	93,3	690

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 15: 2,5-Hexandion

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,12	7,15	96,4	n.n.
10,5	7,17	6,95	94,6	12
15,8	7,06	6,91	94,7	16
23,7	7,00	6,91	92,3	24
35,5	6,79	6,81	93,7	31
53,2	6,56	6,74	92,1	47

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 16: Hydroxyharnstoff

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,19	7,03	95,9	n.n.
9,2	7,25	7,04	96,3	8
13,8	7,31	6,99	93,9	12
20,7	7,25	7,07	95,8	20
31,1	7,22	7,08	95,8	27
46,6	7,17	7,08	95,1	43

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 17: Isobutyl-ethyl-VPA

Konzentration (μ mol/L)	pH-Wert Testbeginn (eingestellt)	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,20	6,86	99,7	n.n.
2.059	6,70	6,89	96,2	4
2.885	7,02	6,95	96,4	4
4.036	7,08	7,08	96,7	8
5.665	6,79	7,06	95,0	12
7.926	6,88	7,15	92,3	16
Kontrolle	7,35	6,97	98,4	n.n.
381	7,03	6,87	98,3	n.n.
534	7,35	6,90	95,9	n.n.
749	7,41	7,01	95,5	n.n.
1.047	7,09	6,95	95,1	n.n.
1.470	7,08	7,15	94,4	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 18: Isoniazid

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,33	7,00	96,8	n.n.
160,4	7,13	6,96	97,0	149
208,5	7,09	6,93	96,7	184
271,3	7,06	6,98	97,3	227
352,3	7,08	6,93	97,7	290
457,9	7,05	6,90	95,7	361
Kontrolle	7,17	7,04	97,8	n.n.
72,9	7,25	7,10	98,0	71
94,8	7,20	7,03	97,2	94
123,2	7,17	7,06	97,6	118
160,4	7,16	7,05	96,6	149
208,5	7,13	7,07	96,2	184

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 19: Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat

Konzentration (μ mol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,28	7,12	98,1	n.n.
0,6	7,19	7,16	95,0	n.n.
0,9	7,16	7,13	94,3	n.n.
1,4	7,23	7,09	94,4	n.n.
2,1	7,23	6,98	93,7	n.n.
3,2	7,19	7,08	93,5	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 20: **D-Mannitol**

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,21	7,07	96,1	n.n.
109,8	7,24	6,87	97,6	110
154,0	7,22	6,84	96,9	157
214,6	7,21	6,87	96,2	220
301,8	7,20	6,84	97,0	306
421,7	7,17	6,77	96,3	447

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 21: **Methoxyessigsäure**

Konzentration (µmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,59	7,34	99,1	n.n.
111	6,82	7,03	99,3	n.n.
189	5,63	5,88	98,7	n.n.
321	4,50	5,45	97,9	n.n.
545	4,13	5,22	95,9	n.n.
927	3,89	4,92	96,6	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 22: **Methoxyessigsäureisopropylester**

Konzentration (µmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,35	7,17	99,3	n.n.
35	7,37	7,12	97,6	n.n.
49	7,38	7,11	97,9	n.n.
69	7,38	7,12	96,7	n.n.
97	7,38	7,12	97,1	n.n.
135	7,38	7,03	97,7	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 23: **2-Methoxyethanol**

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,30	7,07	97,3	n.n.
131,4	7,35	6,97	96,9	145
184,0	7,36	7,05	95,5	200
257,6	7,38	7,06	96,4	278
360,6	7,39	7,02	97,1	392
504,8	7,40	7,03	97,1	549

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 24: **1-Methoxy-2-propanol**

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,16	7,07	93,5	n.n.
66,6	7,21	6,87	94,1	67
93,2	7,25	6,91	93,5	94
130,5	7,24	6,99	94,3	133
182,7	7,31	6,96	94,4	184
255,8	7,28	7,01	93,7	259

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 25: 3-Methyl-1-butanol

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,21	6,91	98,1	n.n.
4,4	7,22	6,88	99,0	n.n.
5,7	7,24	6,94	98,5	n.n.
7,4	7,24	6,97	98,2	n.n.
9,6	7,26	7,05	98,0	8
12,5	7,23	7,06	98,3	8

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 26: Methylcarbamoylcystein

Konzentration (µmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,51	7,18	97,3	n.n.
859	7,18	6,98	89,7	n.n.
1.296	7,11	6,89	88,0	n.n.
1.930	7,03	6,82	86,4	n.n.
2.912	6,95	6,88	86,2	n.n.
4.360	6,86	6,61	85,5	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 27: Methylcarbamoylglutathion

Konzentration (µmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,13	6,87	95,3	n.n.
412	5,09	5,29	94,0	n.n.
618	4,80	5,23	94,8	n.n.
928	4,62	5,14	96,1	n.n.
1.391	4,48	4,85	93,9	n.n.
2.089	4,38	4,68	94,4	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 28: N-Methylformamid

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,33	7,14	97,9	n.n.
135,4	7,09	5,73	96,5	137
189,6	6,92	5,40	95,7	188
265,8	6,79	5,32	96,2	267
372,4	6,64	4,30	96,1	373
519,7	6,49	3,79	96,1	518

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 29: Methylquecksilberchlorid

Konzentration (µmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,47	7,23	92,2	n.n.
0,139	7,76	7,32	94,6	n.n.
0,239	7,81	7,32	93,9	n.n.
0,438	7,80	7,15	93,9	n.n.
0,757	7,79	7,24	93,6	n.n.
1,195	7,80	7,18	93,6	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 30: Penicillin G-Natriumsalz

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,28	7,01	97,6	n.n.
5,5	7,01	5,06	95,4	16
8,3	6,90	4,37	93,4	20
12,5	6,67	4,17	93,2	31
18,7	6,40	4,10	92,2	43
28,0	6,08	4,09	92,2	59

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 31: 2-Propanol

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,37	7,11	97,4	n.n.
52,1	7,27	6,93	96,3	55
72,5	7,27	7,00	95,2	78
101,8	7,29	7,03	94,2	102
142,6	7,30	7,14	93,4	145
199,5	7,29	7,12	92,5	196

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 32: all-trans-Retinol

Konzentration (μ mol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,66	6,98	97,9	n.n.
DMSO	7,68	7,05	96,2	n.n.
0,042	7,69	7,05	96,6	n.n.
0,129	7,72	7,08	96,0	n.n.
0,384	7,69	7,13	95,8	n.n.
1,152	7,70	7,15	95,4	n.n.
3,491	7,68	7,12	93,3	n.n.

DMSO : Lösungsvermittlerkontrolle, Dimethylsulfoxid (14,1 mmol/L); n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 33: Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,47	6,96	95,1	n.n.
46,5	7,36	6,92	96,8	82
60,2	7,36	6,92	95,7	110
78,4	7,33	6,95	96,4	141
102,2	7,31	7,03	95,9	180
132,7	7,28	7,10	96,1	231

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 34: Salicylsäure

Konzentration (μ mol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,17	6,95	97,5	n.n.
105	6,17	6,47	96,6	n.n.
126	5,85	6,20	94,9	n.n.
151	5,32	5,50	95,2	n.n.
181	4,59	5,91	94,9	n.n.
217	4,28	5,51	93,6	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 35: Thalidomid

Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,23	7,25	97,8	nicht bestimmt
19,4	6,84	6,72	97,7	nicht bestimmt
38,7	6,86	6,61	95,9	nicht bestimmt
77,4	6,79	6,36	97,0	nicht bestimmt
154,9	6,81	6,51	96,1	nicht bestimmt
309,8	6,69	6,30	95,1	nicht bestimmt

Tab. A 36: Valpromid

Konzentration (mmol/L)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,16	7,05	103,8	n.n.
3,6	7,18	7,00	106,5	n.n.
5,1	7,19	7,04	104,1	n.n.
7,1	7,18	7,12	104,7	n.n.
10,0	7,16	7,08	101,8	n.n.
14,0	7,13	7,10	100,1	8

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 37: Valpronsäure

Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,16	7,00	98,1	n.n.
56	6,95	6,77	96,6	n.n.
73	6,87	6,69	96,1	n.n.
94	6,68	6,60	93,9	n.n.
123	6,40	6,44	95,5	n.n.
159	5,89	6,03	95,9	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. A 38: Vitamin A-Säure

Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)	pH-Wert Testbeginn	pH-Wert Testende	Sauerstoffsättigung (%)	Osmolarität (mOsmol/L)
Kontrolle	7,20	6,81	93,0	n.n.
DMSO	7,31	6,92	95,1	n.n.
2,080	7,29	6,86	95,5	n.n.
4,161	7,29	6,72	95,4	n.n.
8,321	7,27	6,74	94,6	n.n.
16,642	7,23	6,78	94,0	4
33,285	7,19	6,76	93,7	8
Kontrolle	7,65	7,36	95,7	n.n.
DMSO	7,71	7,41	94,6	n.n.
0,004	7,70	7,44	93,5	n.n.
0,008	7,73	7,53	93,3	n.n.
0,013	7,72	7,53	92,9	n.n.
0,023	7,75	7,59	91,4	n.n.
0,033	7,76	7,57	91,1	n.n.

DMSO : Lösungsvermittlerkontrolle, Dimethylsulfoxid (14,1 mmol/L); n.n. : nicht nachweisbar

11 Anhang B

Die ermittelten Daten zur Somitenzahl (16 h), Herzschlagfrequenz (48 h) und Schwanzlänge (120 h) sind für die alphabetisch geordneten Testsubstanzen aufgeführt.

Aceton Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration (mmol/L)				
	Kontrolle	111,9	134,3	161,8	192,8
	156	156	144	152	136
	148	148	148	140	80
	152	148	140	136	84
	160	144	148	132	128
	156	132	136	152	120
	160	156	148	108	92
	156	132	148	116	100
	152	148	144	100	96
	152	156	148	136	112
	160	152	136	100	104
	156	148	148	88	80
	160	148	144	140	104
	144	156	132	140	72
	152	152	156	124	96
	160	132	144	124	148
	152	136	160	108	
	148	120	144	116	
	156	144	136	128	
	148	140	124		
	152	144	148		
Median Z	154	148	144	126	100
Q _{0,25}	152	139	139	110	88
Q _{0,75}	157	152	148	139	116

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Acetylsalicylsäure Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration (µmol/L)			
	Kontrolle	111	155	216
	1,63	1,58	1,56	1,53
	1,65	1,58	1,60	1,43
	1,65	1,56	1,48	1,31
	1,58	1,51	1,53	1,53
	1,58	1,63	1,60	1,51
	1,65	1,58	1,53	1,43
	1,53	1,65	1,58	1,56
	1,58	1,63	1,58	1,56
	1,53	1,65	1,53	1,48
	1,60	1,56	1,48	1,51
	1,60	1,56	1,63	1,51
	1,56	1,58	1,58	1,58
	1,65	1,48	1,53	
	1,56	1,53	1,53	
	1,53	1,60	1,60	
	1,58	1,58	1,43	
	1,65	1,60		
	1,65	1,53		
	1,58	1,58		
	1,53	1,43		
Median Z	1,58	1,58	1,55	1,51
Q _{0,25}	1,56	1,55	1,53	1,47
Q _{0,75}	1,65	1,60	1,59	1,54

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Butyldiglykol Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration (mmol/L)				
	Kontrolle	3,7	4,8	6,2	8,1
176	176	172	184	160	
172	180	184	180	172	
180	176	176	192	172	
188	176	180	184	168	
184	184	172	168	180	
176	172	200	196	164	
180	176	160	172	168	
168	184	168	168	152	
188	180	176	172	144	
176	172	168	184	168	
180	176	176	176	172	
188	180	180	172	164	
172	176	184	172		
172	172	180	172		
176	184	184	172		
176	176	176	172		
180	172	172	180		
176	176	168			
192	180	164			
176	180	180			
Median Z	176	176	176	172	168
Q _{0,25}	176	176	171	172	163
Q _{0,75}	181	180	180	184	172

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Butyldiglykol Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden**

	Konzentration (mmol/L)				
	Kontrolle	3,7	4,8	6,2	8,1
1,51	1,60	1,60	1,58	1,60	
1,60	1,60	1,60	1,56	1,53	
1,58	1,60	1,51	1,53	1,60	
1,56	1,58	1,58	1,60	1,53	
1,53	1,58	1,53	1,58	1,56	
1,63	1,51	1,51	1,56	1,56	
1,51	1,58	1,65	1,46	1,60	
1,58	1,53	1,58	1,56	1,51	
1,63	1,51	1,53	1,63	1,53	
1,60	1,53	1,65	1,48	1,51	
1,58	1,68	1,58	1,53	1,51	
1,60	1,56	1,63	1,60	1,60	
1,58	1,58	1,51	1,56		
1,56	1,58	1,56	1,60		
1,58	1,58	1,56	1,58		
1,56	1,63	1,53	1,51		
1,48	1,56	1,56	1,56		
1,60	1,56	1,53			
1,56	1,53	1,56			
1,60	1,56	1,58			
Median Z	1,58	1,58	1,56	1,56	1,55
Q _{0,25}	1,56	1,55	1,53	1,53	1,53
Q _{0,75}	1,60	1,59	1,59	1,58	1,60

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Colcemid Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)			
	Kontrolle	3,2	5,4	9,2
	1,56	1,48	1,53	1,53
	1,56	1,58	1,46	1,58
	1,53	1,63	1,56	1,38
	1,63	1,53	1,58	1,46
	1,43	1,70	1,60	1,48
	1,56	1,48	1,60	1,58
	1,48	1,53	1,56	
	1,48	1,63	1,48	
	1,58	1,53	1,51	
	1,56	1,56	1,48	
	1,58	1,56	1,51	
	1,65	1,48	1,51	
	1,65	1,51	1,48	
	1,63	1,56	1,56	
	1,58	1,58	1,58	
	1,56	1,48	1,65	
	1,48	1,58	1,58	
	1,60	1,53	1,53	
	1,65	1,53	1,58	
		1,58	1,60	
Median Z	1,56	1,55	1,56	1,51
Q _{0,25}	1,55	1,53	1,51	1,47
Q _{0,75}	1,62	1,58	1,58	1,57

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Cycloheximid Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden**

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)		
	Kontrolle	1,8	3,6
	1,58	1,63	1,53
	1,68	1,60	1,56
	1,56	1,63	1,46
	1,60	1,73	1,51
	1,51	1,53	1,46
	1,58	1,56	1,48
	1,63	1,60	1,53
	1,60	1,63	1,65
	1,53	1,60	1,56
	1,53	1,48	1,51
	1,56	1,53	1,58
	1,63	1,53	1,60
	1,63	1,63	
	1,60	1,68	
	1,68	1,53	
	1,58	1,65	
	1,70	1,60	
	1,63	1,58	
	1,60	1,51	
	1,68	1,63	
Mittelwert	1,60	1,59	1,54
s	0,05	0,06	0,06

s : Standardabweichung

Diethylenglykol Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration (mmol/L)			
	Kontrolle	214,4	278,7	362,3
180	156	172	100	
176	164	168	160	
176	172	180	152	
176	180	180	144	
188	176	172	148	
168	164	180	140	
172	172	160	156	
160	176	168	112	
176	180	156	180	
168	164	176	152	
168	184	176	96	
180	164	116	80	
176	152	132		
168	172	168		
172	140	172		
180	172	96		
	160	168		
	164	164		
	168	156		
	172			
Median Z	176	170	168	146
Q _{0,25}	168	164	158	109
Q _{0,75}	177	173	174	153

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Diethylenglykoldimethylether Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden**

	Konzentration (mmol/L)					
	Kontrolle	7,5	12,7	21,5	36,6	62,2
1,60	1,68	1,65	1,56	1,63	1,58	
1,60	1,63	1,58	1,68	1,65	1,31	
1,63	1,65	1,68	1,51	1,41	1,60	
1,56	1,68	1,58	1,60	1,58	1,43	
1,63	1,58	1,68	1,58	1,58	1,51	
1,58	1,68	1,56	1,65	1,53	1,48	
1,60	1,60	1,53	1,48	1,53	1,51	
1,58	1,65	1,63	1,51	1,63	1,53	
1,65	1,56	1,53	1,63	1,56	1,60	
1,58	1,65	1,60	1,60	1,60	1,48	
1,65	1,70	1,70	1,68	1,65	1,60	
1,63	1,65	1,58	1,56	1,58	1,58	
1,63	1,60	1,58	1,56	1,63	1,43	
1,65	1,58	1,53	1,65	1,58		
1,65	1,63	1,65	1,58	1,53		
1,56	1,68	1,68	1,60	1,53		
1,63	1,65	1,56	1,63	1,56		
1,58	1,60	1,65	1,60	1,60		
1,70	1,60	1,48	1,53	1,53		
1,63	1,53	1,60	1,63	1,60		
Median Z	1,63	1,64	1,59	1,60	1,58	1,51
Q _{0,25}	1,58	1,60	1,56	1,56	1,53	1,48
Q _{0,75}	1,64	1,66	1,65	1,63	1,61	1,58

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

EM 12 Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	EM 12 (1.658 $\mu\text{mol/L}$)				
	Kontrolle	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
	1,68	1,63	1,65	1,58	1,65
	1,63	1,60	1,63	1,56	1,63
	1,56	1,65	1,56	1,63	1,73
	1,63	1,58	1,56	1,58	1,68
	1,70	1,48	1,68	1,60	1,60
	1,63	1,58	1,56	1,60	1,48
	1,60	1,58	1,58	1,53	1,65
	1,63	1,56	1,63	1,65	1,63
	1,56	1,60	1,60	1,53	1,65
	1,68	1,63			1,63
	1,65	1,58			1,68
	1,70	1,58			1,60
	1,60	1,63			1,70
	1,60	1,63			1,68
	1,68	1,60			1,70
	1,63	1,53			
		1,63			
		1,58			
		1,68			
Median Z	1,63	1,60	1,60	1,58	1,65
Q _{0,25}	1,60	1,58	1,56	1,56	1,63
Q _{0,75}	1,68	1,63	1,63	1,60	1,68

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Ethanol Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden**

	Konzentration (mmol/L)					
	Kontrolle	141,1	169,3	204,0	243,1	293,0
	156	156	160	160	160	64
	152	152	160	160	120	104
	148	148	128	148	120	60
	144	148	156	160	108	112
	148	144	152	136	152	
	148	156	160	156	124	
	160	156	128	144	124	
	160	156	160	140	96	
	152	152	156	144	156	
	148	164	148	88	152	
	156	160	144	152	120	
	148	148	160	132	148	
	160	144	168	144		
	160	160	140	144		
	164	160	140	140		
	156	160	140	116		
	156	148	160	164		
	156	160	160	160		
	160	148	156	156		
	156	156	140			
Median Z	156	156	156	144	124	84
Q _{0,25}	148	148	140	140	120	63
Q _{0,75}	160	160	160	158	152	106

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Glucose Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration (mmol/L)			
	Kontrolle	222,0	288,6	375,2
192	188	176	60	
176	172	184	100	
180	176	172	136	
184	192	184	48	
176	204	188	88	
192	176	168	124	
172	188	168	44	
180	176	172	108	
156	172	184	56	
176	172	164	136	
172	188	172	116	
176	180	180	116	
192	168	168	92	
176	176	172	140	
200	192	148	56	
176	184	144	120	
192	164	168	140	
192	172	176	136	
172	180		108	
160				
Median Z	176	176	172	108
Q _{0,25}	175	172	168	74
Q _{0,75}	192	188	179	130

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Hydroxyharnstoff Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration (mmol/L)		
	Kontrolle	9,2	13,8
1,48	1,56	1,65	
1,58	1,63	1,58	
1,60	1,58	1,60	
1,63	1,65	1,26	
1,60	1,65	1,73	
1,58	1,68	1,41	
1,65	1,70	1,53	
1,68	1,75	1,65	
1,53	1,63	1,48	
1,63	1,78	1,56	
1,56	1,41	1,58	
1,51	1,73		
1,53	1,53		
1,51	1,60		
1,58	1,53		
1,48	1,68		
1,63			
1,60			
Mittelwert x	1,58	1,63	1,55
s	0,06	0,09	0,13

s : Standardabweichung

Isobutyl-ethyl-VPA Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
	Kontrolle	381	534	749	1.047	1.470
1,53	1,51	1,46	1,43	1,36	1,26	
1,60	1,48	1,48	1,51	1,43	1,41	
1,48	1,56	1,56	1,41	1,16	1,28	
1,65	1,51	1,58	1,53	1,36	1,31	
1,43	1,65	1,43	1,51	1,31	1,43	
1,48	1,58	1,36	1,48	1,26	1,33	
1,56	1,65	1,58	1,48	1,41	1,36	
1,63	1,46	1,48	1,48	1,26	1,28	
1,58	1,51	1,56	1,28	1,14	1,21	
1,56	1,56	1,56	1,41	1,41	1,31	
1,48	1,56	1,51	1,53	1,31	1,33	
1,53	1,51	1,46	1,58	1,36		
1,65	1,48	1,51	1,53	1,04		
1,53	1,48	1,46	1,48	1,43		
1,56	1,51	1,58	1,63	1,43		
1,58	1,58	1,53	1,46	1,36		
1,53	1,60	1,53	1,43	1,43		
1,73	1,56	1,48	1,41	1,33		
1,63	1,56	1,43	1,53	1,31		
1,58		1,51				
Median Z	1,56	1,56	1,51	1,48	1,36	1,31
Q _{0,25}	1,53	1,51	1,46	1,43	1,29	1,28
Q _{0,75}	1,61	1,57	1,56	1,53	1,41	1,35

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden**

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)				
	Kontrolle	0,6	0,9	1,4	2,1
172	172	172	172	152	
172	164	176	176	152	
188	176	176	160	172	
188	168	172	172	168	
188	176	172	172	172	
192	172	168	168	160	
172	172	172	160		
176	188	184	152		
184	172	168	156		
196	172	172	160		
184	188	168	156		
188	172	176	168		
160	176	180	164		
192	188	184	160		
172	184	180	164		
184	188	176	168		
172	176	180	172		
188	176	172	160		
168	184	176	156		
188	192	176			
Median Z	184	176	176	164	164
Q _{0,25}	172	172	172	160	154
Q _{0,75}	188	185	177	170	171

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Methoxyessigsäure Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
	Kontrolle	33	50	74	111	167
1,58	1,60	1,58	1,58	1,56	1,63	
1,75	1,65	1,65	1,56	1,58	1,60	
1,58	1,60	1,60	1,58	1,68	1,56	
1,63	1,60	1,65	1,63	1,58	1,60	
1,63	1,60	1,58	1,63	1,53	1,56	
1,60	1,63	1,56	1,63	1,56	1,53	
1,65	1,63	1,58	1,60	1,60	1,53	
1,65	1,63	1,60	1,58	1,53	1,58	
1,65	1,58	1,56	1,63	1,58	1,58	
1,65	1,63	1,58	1,60	1,58	1,58	
1,60	1,65	1,63	1,58	1,60	1,56	
1,65	1,65	1,68	1,53	1,65	1,63	
1,65	1,68	1,60	1,58	1,53	1,51	
1,56	1,65	1,75	1,63	1,51	1,56	
1,65	1,60	1,56	1,60	1,56	1,58	
1,63	1,58	1,58	1,58	1,65	1,53	
1,63	1,68	1,65	1,60	1,60	1,56	
1,60	1,73	1,68	1,58	1,58	1,53	
1,58	1,58	1,60	1,56	1,56	1,51	
1,58	1,65	1,63	1,60	1,58	1,53	
Median Z	1,63	1,63	1,60	1,59	1,58	1,56
Q _{0,25}	1,60	1,60	1,58	1,58	1,56	1,53
Q _{0,75}	1,65	1,65	1,65	1,61	1,60	1,58

Q 0,25 : unteres Quartil; Q 0,75 : oberes Quartil

2-Methoxyethanol Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration (mmol/L)			
	Kontrolle	131,4	184,0	257,6
164	164	152	120	
176	168	148	84	
172	176	148	60	
168	152	132	116	
184	172	156	64	
176	160	156	96	
180	156	152	88	
192	172	148	52	
160	160	148	96	
176	176	152	96	
176	156	144	116	
180	148	164	84	
192	148	144	108	
176	152	160	116	
176	156	156	88	
172	164	148	104	
200	164	132	88	
176	148	148		
184	156	152		
172	164	124		
Median Z	176	160	148	96
Q _{0,25}	172	155	147	84
Q _{0,75}	181	165	153	108

Q 0,25 : unteres Quartil; Q 0,75 : oberes Quartil

2-Methoxyethanol Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration (mmol/L)			
	Kontrolle	131,4	184,0	257,6
1,68	1,48	1,38	0,86	
1,63	1,38	1,48	1,16	
1,65	1,43	1,43	1,19	
1,65	1,58	1,46	1,09	
1,75	1,46	1,41	1,16	
1,70	1,51	1,43		
1,65	1,53	1,48		
1,65	1,48	1,43		
1,60	1,51	1,41		
1,58	1,60	1,21		
1,63	1,48	1,48		
1,53	1,51	1,51		
1,60	1,51	1,51		
1,65	1,53	1,53		
1,60	1,48	1,53		
1,63	1,56	1,43		
1,60	1,41	1,46		
1,56	1,68	1,31		
1,58	1,48			
1,58				
Median Z	1,63	1,51	1,45	1,16
Q _{0,25}	1,60	1,48	1,42	1,09
Q _{0,75}	1,65	1,53	1,48	1,16

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**1-Methoxy-2-propanol** Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration (mmol/L)			
	Kontrolle	66,6	93,2	130,5
1,51	1,63	1,56	1,38	
1,48	1,56	1,63	1,53	
1,58	1,60	1,60	1,48	
1,51	1,53	1,58	1,60	
1,56	1,56	1,48	1,51	
1,53	1,53	1,53	1,04	
1,63	1,48	1,51	1,48	
1,56	1,58	1,63	1,48	
1,58	1,53	1,46		
1,65	1,63	1,60		
1,53	1,60	1,53		
1,63	1,53	1,43		
1,56	1,51	1,48		
1,58	1,63	1,46		
1,56	1,58	1,53		
1,63	1,63	1,51		
1,53	1,60	1,53		
1,58	1,58	1,48		
1,58	1,53			
Median Z	1,56	1,58	1,53	1,48
Q _{0,25}	1,53	1,53	1,48	1,46
Q _{0,75}	1,58	1,60	1,58	1,52

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

3-Methyl-1-butanol Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration (mmol/L)					
	Kontrolle	4,4	5,7	7,4	9,6	12,5
188	184	184	184	124	104	
192	192	184	188	96	76	
188	200	188	184	124	104	
192	192	192	160	156	100	
192	168	180	188	140	100	
200	200	176	172	132		
184	184	188	180	96		
188	180	192	152	160		
192	172	188	152	140		
184	172	176	180	140		
188	184	168	168	96		
188	196	184	180	132		
192	188	184	200	168		
188	184	180	184	164		
176	188	196	184	124		
204	196	188	192	164		
168	192	184	172	136		
184	192	172	172			
184	188	180	144			
180	184	148	176			
Median Z	188	188	184	180	136	100
Q _{0,25}	184	184	179	171	124	100
Q _{0,75}	192	192	188	184	156	104

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**3-Methyl-1-butanol** Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration (mmol/L)				
	Kontrolle	4,4	5,7	7,4	9,6
1,58	1,58	1,60	1,53	1,60	
1,60	1,65	1,58	1,58	1,56	
1,58	1,60	1,56	1,60	1,58	
1,58	1,65	1,60	1,60	1,65	
1,65	1,63	1,63	1,60	1,56	
1,60	1,58	1,53	1,58	1,63	
1,56	1,53	1,60	1,53	1,53	
1,58	1,63	1,58	1,63	1,65	
1,58	1,60	1,63	1,58		
1,60	1,58	1,58	1,63		
1,56	1,65	1,58	1,65		
1,58	1,56	1,60	1,56		
1,65	1,63	1,56	1,60		
1,63	1,56	1,65	1,60		
1,58	1,58	1,58	1,56		
1,63	1,56	1,63	1,58		
1,68	1,65	1,58	1,56		
1,63		1,56			
1,66					
Median Z	1,60	1,60	1,58	1,58	1,59
Q _{0,25}	1,58	1,58	1,58	1,56	1,56
Q _{0,75}	1,63	1,63	1,60	1,60	1,64

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Methylcarbamoylcystein Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
	Kontrolle	168	253	382	572	859
	192	172	156	148	144	120
	176	132	156	144	144	72
	188	164	152	172	152	124
	172	184	164	128	128	84
	168	164	156	144	128	84
	188	160	156	144	140	112
	184	176	152	152	144	108
	180	164	164	152	116	108
	176	156	160	152	132	120
	192	180	164	160	136	120
	188	176	144	132	148	108
	200	136	160	136	136	116
	184	156	160	164	124	116
	196	148	164	152	136	128
	188	172	156	148	128	120
	184	172	156	136	136	108
	184	164	144	132	124	112
	176	168	160	136	144	96
	180			144	140	104
				140		
Median Z	184	164	156	144	136	112
Q _{0,25}	178	157	156	136	128	106
Q _{0,75}	188	172	160	152	144	120

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Methylcarbamoylcystein Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden**

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)				
	Kontrolle	168	253	382	572
	1,53	1,48	1,58	1,51	1,60
	1,58	1,46	1,56	1,48	1,58
	1,60	1,51	1,58	1,51	1,56
	1,65	1,53	1,53	1,48	1,51
	1,60	1,48	1,51	1,53	1,33
	1,63	1,43	1,60	1,56	1,51
	1,65	1,48	1,60	1,58	1,41
	1,63	1,58	1,48	1,36	1,58
	1,58	1,51	1,56	1,46	1,46
	1,68	1,53	1,48	1,60	1,58
	1,56	1,56	1,56	1,36	1,38
	1,58	1,58	1,43	1,60	1,46
	1,56	1,48	1,53	1,58	1,38
	1,58	1,51	1,51	1,48	1,41
	1,58	1,51	1,46	1,56	1,38
	1,58	1,53	1,48	1,58	1,48
	1,63	1,53	1,51	1,48	
	1,56		1,51	1,51	
				1,51	
				1,48	
Median Z	1,58	1,51	1,52	1,51	1,47
Q _{0,25}	1,58	1,48	1,49	1,48	1,40
Q _{0,75}	1,63	1,53	1,56	1,57	1,57

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Methylcarbamoyleglutathion Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)		
	Kontrolle	412	618
184	164	140	
184	148	116	
172	152	152	
180	152	116	
180	160	136	
200	164	140	
192	144	148	
188	148	144	
172	148	140	
172	148	132	
176	136	120	
192	144	156	
184	156	136	
200	184	140	
192	156	144	
184	180	100	
172	176	96	
164	172	136	
184	164		
172	136		
Median Z	184	154	138
Q _{0,25}	172	148	123
Q _{0,75}	189	164	143

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Methylcarbamoyleglutathion Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden**

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)		
	Kontrolle	412	618
1,58	1,46	1,58	
1,56	1,48	1,41	
1,53	1,51	1,51	
1,60	1,53	1,46	
1,58	1,56	1,53	
1,53	1,46	1,51	
1,56	1,51	1,48	
1,63	1,48	1,36	
1,53	1,56	1,41	
1,53	1,56	1,51	
1,53	1,58	1,41	
1,56	1,51		
1,60	1,51		
1,58	1,60		
1,65	1,48		
1,56	1,51		
1,63	1,53		
1,53	1,48		
1,58	1,58		
1,53	1,53		
Median Z	1,56	1,51	1,48
Q _{0,25}	1,53	1,48	1,41
Q _{0,75}	1,59	1,56	1,51

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

N-Methylformamid Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration (mmol/L)		
	Kontrolle	135,4	189,6
1,58	1,58	1,56	
1,58	1,70	1,36	
1,63	1,68	1,60	
1,70	1,65	1,60	
1,70	1,58	1,68	
1,63	1,53	1,56	
1,73	1,63	1,63	
1,63	1,63	1,63	
1,56	1,60	1,65	
1,63	1,68	1,33	
1,58	1,56	1,53	
1,60	1,56	1,58	
1,65	1,65	1,68	
1,58	1,63	1,51	
1,58	1,60	1,68	
1,73	1,58		
1,70	1,60		
1,60	1,65		
1,63			
1,60			
Median Z	1,63	1,62	1,60
Q _{0,25}	1,58	1,58	1,55
Q _{0,75}	1,66	1,65	1,64

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Methylquecksilberchlorid** Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration (µmol/L)			
	Kontrolle	0,139	0,239	0,438
156	160	144	104	
164	164	148	72	
168	156	140	60	
168	160	136	44	
164	152	152	48	
156	156	136	68	
160	156	160	52	
160	152	148	48	
164	156	160	57	
168	168	152	96	
168	152	156	84	
164	152	148	44	
168	156	144	108	
164	152	156	80	
164	152	152		
160	152	160		
152	156	156		
176	168	160		
	132	136		
		152		
Median Z	164	156	152	64
Q _{0,25}	160	152	144	49
Q _{0,75}	168	158	156	83

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Methylquecksilberchlorid Schwanzlänge (mm) nach 48 Stunden

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)		
	Kontrolle	0,139	0,239
1,27	0,95	0,85	
1,18	1,16	0,91	
1,21	1,16	0,91	
1,22	1,06	0,75	
1,22	1,18	1,00	
1,26	1,19	0,91	
1,26	1,16	1,03	
1,18	1,08	0,86	
1,32	1,22	1,09	
1,27	1,18	1,03	
1,18	1,16	1,11	
1,21	1,11	0,64	
1,24	1,24	1,11	
1,21	1,21	1,01	
1,19	1,08	0,93	
1,19	1,09	0,85	
1,21	1,13	1,03	
	1,16	1,04	
	0,98	1,22	
		0,98	
Median Z	1,21	1,16	0,99
Q _{0,25}	1,19	1,09	0,90
Q _{0,75}	1,26	1,18	1,03

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Penicillin G-Natriumsalz Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden**

	Konzentration (mmol/L)			
	Kontrolle	5,5	8,3	12,5
160	200	192	144	
172	164	172	140	
168	176	176	184	
188	168	168	168	
160	176	172	172	
172	172	168	176	
172	188	172	176	
172	176	164	164	
184	168	156	172	
196	172	184	152	
184	172	152	172	
188	188	168	168	
188	172	164	164	
172	168	176	176	
172	172	180	168	
176	188	180	176	
152	176	172	172	
156	184	164	160	
172	176	184		
152	184			
Median Z	172	176	172	170
Q _{0,25}	166	172	166	164
Q _{0,75}	184	184	178	175

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

2-Propanol Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration (mmol/L)				
	Kontrolle	52,1	72,5	101,8	142,6
172	176	172	176	100	
176	172	164	184	96	
188	184	168	172	100	
172	184	176	156	132	
172	184	176	160	100	
184	164	188	188	88	
168	172	176	112	136	
192	196	176	172	112	
172	176	176	144	100	
192	172	168	144	108	
184	188	172	172	104	
180	184	188	172	104	
168	180	192	148		
188	172	172	120		
188	180	184	164		
176	176	168	176		
184	188	184	132		
176	184	172	148		
184	172	180	128		
	180	176	168		
Median Z	180	180	176	162	102
Q _{0,25}	172	172	172	144	100
Q _{0,75}	186	184	181	172	109

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**2-Propanol** Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration (mmol/L)			
	Kontrolle	52,1	72,5	101,8
1,53	1,56	1,51	1,63	
1,60	1,58	1,53	1,53	
1,53	1,63	1,53	1,51	
1,56	1,53	1,56	1,58	
1,48	1,63	1,56	1,43	
1,60	1,58	1,53	1,46	
1,56	1,58	1,53	1,56	
1,56	1,53	1,58	1,60	
1,60	1,53	1,53	1,56	
1,56	1,56	1,60	1,53	
1,60	1,56	1,58		
1,58	1,58	1,60		
1,63	1,56	1,60		
1,60	1,56	1,53		
1,56	1,60	1,63		
1,58	1,65	1,60		
1,68	1,63	1,56		
1,63	1,48	1,48		
1,56	1,53	1,51		
	1,58			
Mittelwert	1,58	1,56	1,54	
s	0,04	0,04	0,06	

s : Standardabweichung

all-trans-Retinol Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)					
	Kontrolle	DMSO	0,042	0,129	0,384	1,152
	1,63	1,58	1,58	1,56	1,63	1,53
	1,56	1,63	1,65	1,60	1,53	1,56
	1,63	1,58	1,60	1,58	1,58	1,58
	1,63	1,65	1,60	1,60	1,56	1,53
	1,63	1,60	1,70	1,65	1,60	1,53
	1,68	1,63	1,58	1,56	1,51	1,56
	1,56	1,68	1,63	1,65	1,56	1,51
	1,68	1,63	1,65	1,60	1,58	1,60
	1,68	1,63	1,60	1,65	1,56	1,60
	1,70	1,65	1,65	1,63	1,60	1,58
	1,60	1,58	1,63	1,58	1,53	1,53
	1,68	1,68	1,60	1,56	1,60	1,53
	1,58	1,65	1,58	1,63	1,53	1,58
	1,56	1,65	1,65	1,63	1,48	1,65
	1,63	1,60	1,63	1,58	1,60	1,60
	1,68	1,56	1,58	1,60	1,51	1,51
	1,65	1,65	1,63	1,63	1,60	1,46
	1,58	1,60	1,60	1,60	1,65	1,53
	1,65	1,60	1,63	1,56	1,60	1,48
	1,58	1,63	1,58	1,56	1,58	1,58
	1,58	1,63				
	1,65	1,68				
Median Z	1,63	1,63	1,62	1,60	1,58	1,55
Q _{0,25}	1,58	1,60	1,60	1,58	1,53	1,53
Q _{0,75}	1,67	1,65	1,64	1,63	1,60	1,58

DMSO : Lösungsvermittlerkontrolle, Dimethylsulfoxid (14,1 mmol/L); Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat Herzschläge (1/min) nach 48 Stunden

	Konzentration (mmol/L)				
	Kontrolle	46,5	60,2	78,4	102,2
	160	172	200	172	172
	180	188	180	168	188
	172	184	180	180	172
	172	164	160	180	180
	176	172	184	200	176
	164	172	176	180	184
	180	192	164	180	188
	172	176	172	180	100
	180	184	176	172	184
	172	180	164	188	176
	180	184	168	180	172
	176	192	180	184	
	164	172	176	172	
	188	176	184	168	
	180	176	180	172	
	184	108	164	180	
	184	108	176	180	
	188	172	176	176	
	176	172	176	164	
	188		96		
Median Z	178	176	176	180	176
Q _{0,25}	172	172	167	172	172
Q _{0,75}	181	184	180	180	184

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Saccharin-Natriumsalz-Dihydrat Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration (mmol/L)				
	Kontrolle	46,5	60,2	78,4	102,2
1,60	1,53	1,65	1,60	1,58	
1,53	1,58	1,48	1,51	1,58	
1,51	1,60	1,58	1,65	1,68	
1,56	1,58	1,65	1,63	1,63	
1,68	1,58	1,63	1,68	1,63	
1,63	1,68	1,58	1,53	1,56	
1,53	1,53	1,63	1,60	1,51	
1,51	1,53	1,53	1,53	1,58	
1,70	1,56	1,63	1,58	1,43	
1,58	1,58	1,63	1,51	1,58	
1,63	1,56	1,58	1,56		
1,58	1,58	1,63	1,43		
1,68	1,56	1,68	1,63		
1,63	1,63	1,56	1,70		
1,56	1,60	1,58	1,70		
1,51	1,48	1,58	1,53		
1,63	1,51	1,43	1,58		
1,60	1,48	1,51	1,60		
1,63	1,58	1,60	1,65		
1,65		1,63			
Median Z	1,60	1,58	1,59	1,60	1,58
Q _{0,25}	1,55	1,53	1,58	1,53	1,57
Q _{0,75}	1,63	1,58	1,63	1,64	1,62

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Salicylsäure** Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration (µmol/L)			
	Kontrolle	105	126	150
1,63	1,56	1,56	1,63	
1,56	1,58	1,53	1,60	
1,65	1,51	1,56	1,48	
1,58	1,58	1,53	1,63	
1,58	1,63	1,58	1,58	
1,68	1,63	1,58	1,60	
1,60	1,65	1,60	1,60	
1,53	1,53	1,60	1,56	
1,58	1,53	1,68	1,56	
1,56	1,58	1,68	1,63	
1,68	1,58	1,60	1,56	
1,60	1,48	1,65	1,53	
1,58	1,60	1,53	1,63	
1,53	1,51	1,60	1,56	
1,56	1,58	1,51	1,53	
1,53	1,53	1,53	1,56	
1,48	1,60	1,58	1,60	
1,58	1,58	1,60	1,60	
1,65	1,58		1,53	
1,58	1,53			
Median Z	1,58	1,58	1,58	1,58
Q _{0,25}	1,56	1,53	1,54	1,56
Q _{0,75}	1,61	1,59	1,60	1,60

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Valpromid Somitenanzahl nach 16 Stunden

	Konzentration (mmol/L)			
	Kontrolle	3,6	5,1	7,1
11	8	8	7	
11	9	7	6	
12	10	9	6	
12	10	7	7	
11	9	8	8	
10	9	10	6	
10	8	8	5	
11	9	7	6	
10	9	8	5	
10	8	8	5	
11	10	6	6	
11	8	7	6	
9	9	8	5	
10	9	6	5	
9	9	6		
10	9	10		
9	9	7		
8	8	8		
8	9			
9	10			
Median Z	10	9	8	6
Q _{0,25}	9	9	7	5
Q _{0,75}	11	9	8	6

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil**Valpromid Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden**

	Konzentration (mmol/L)		
	Kontrolle	3,6	5,1
1,63	1,38	1,41	
1,78	1,53	1,41	
1,65	1,46	1,41	
1,63	1,53	1,53	
1,60	1,63	1,38	
1,58	1,53	1,38	
1,63	1,51	1,43	
1,58	1,41	1,46	
1,60	1,48	1,48	
1,73	1,46	1,48	
1,68	1,28	1,53	
1,58	1,60	1,43	
1,56	1,38	1,46	
1,53	1,43	1,38	
1,65	1,48		
1,58	1,58		
1,43	1,51		
1,63	1,58		
1,63			
1,63			
Median Z	1,63	1,50	1,43
Q _{0,25}	1,58	1,44	1,41
Q _{0,75}	1,64	1,53	1,48

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Valpronsäure Schwanzlänge (mm) nach 120 Stunden

	Konzentration ($\mu\text{mol/L}$)		
	Kontrolle	55	72
1,58	1,41	1,23	
1,65	1,19	1,23	
1,68	1,41	1,19	
1,75	1,56	1,21	
1,65	1,38	1,16	
1,58	1,43	1,38	
1,56	1,38	1,26	
1,63	1,48	1,21	
1,78	1,41	1,21	
1,68	1,43		
1,60	1,43		
1,65	1,38		
1,63	1,19		
1,63	1,38		
1,65	1,43		
1,68	1,26		
1,65	1,33		
1,63	1,33		
1,56	1,41		
1,68			
Median Z	1,65	1,41	1,21
Q_{0,25}	1,62	1,36	1,21
Q_{0,75}	1,68	1,43	1,23

Q_{0,25} : unteres Quartil; Q_{0,75} : oberes Quartil

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als diese kenntlich gemacht worden. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Alle Personen, von denen Daten in die vorliegende Arbeit aufgenommen wurden, sind im Text erwähnt. Alle Personen, die in sonstiger Form zur vorliegenden Arbeit beigetragen haben, werden in der Danksagung genannt.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe des Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke der Promotion vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden.

Ich bestätige, daß ich die Promotionsordnung der Fakultät Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften der TU Dresden anerkenne.

Jean Bachmann

Lebenslauf

Jean Bachmann

geboren am 17. Juli 1969 in Meißen

wohnhaft: Osterbergstr. 26
01127 Dresden

Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Bildungsgang

- seit 4 / 1997 Promotionsstudent am Institut für Hydrobiologie der Technischen Universität Dresden, Arbeitsgruppe Ökotoxikologie (Prof. Dr. Roland Nagel), Dissertation „Entwicklung und Erprobung eines Teratogenitäts-Screening Testes mit Embryonen des Zebraärlblings *Danio rerio*“
- 11 / 1996 Abschluß des Studiums als Diplombiologe, cum laude
- 11 / 1995 – 10 / 1996 Diplomarbeit: „Wirkung von Chemikalien auf die Embryonal-entwicklung des Zebraärlblings (*Brachydanio rerio*)“, magna cum laude
- 10 / 1991 – 11 / 1996 Studium der Biologie, Technischen Hydrobiologie und Ökotoxikologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena und der Technischen Universität Dresden
- 9 / 1988 – 6 / 1991 Wehrdienst
- 9 / 1986 – 8 / 1988 Erweiterte Oberschule Meißen (Gymnasium), Abitur

Berufserfahrung

- 10 / 2001 – 12 / 2001 Honorarangestellter am Institut für Hydrobiologie der TU Dresden, Arbeitsgruppe Ökotoxikologie, Projekt: „International laboratory comparison study to validate the guideline Fish Life-Cycle Test with the zebrafish“
- 4 / 1999 – 5 / 2001 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Hydrobiologie der TU Dresden, Arbeitsgruppe Ökotoxikologie
Projekte: „Untersuchung kodierter Substanzen mit dem *DarT*-Test“ und „Enhancement of the preliminary EU-concept of assessing the impact of chemicals to plants in sediment by using selected substances“
- 4 / 1997 – 12 / 1998 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Hydrobiologie der TU Dresden, Arbeitsgruppe Ökotoxikologie
Projekt: „Entwicklung eines Teratogenitäts Screening-Testes mit *Danio rerio* – *DarT*“
- 12 / 1996 – 3 / 1997 studentische Hilfskraft an der Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften der TU Dresden

HSSS AdminTools (c) 2001, last visited: Mon Nov 11 11:32:50 GMT+01:00 2002