

FISCHEMBRYOTESTS ALS SCREENING-TEST FÜR UNERWÜNSCHTE NEBENWIRKUNGEN VON PFLANZENSCHUTZMITTELN

FISH EMBRYO TESTS AS A SCREENING TOOL FOR ADVERSE EFFECTS OF PLANT PROTECTION PRODUCTS

Hintergrund und Ziele

Fische sind aufgrund ihrer Kiemenatmung im besonderen Maße von Schadstoffbelastungen betroffen und werden daher als repräsentative Wirbeltiervertreter in der Umweltrisikobewertung eingesetzt. Eine verschärfte Gesetzeslage aufgrund sozial-ethischer Bedenken gegenüber Tierversuchen führte 2004 zur Einführung des Fischembryotests FET als Ersatzmethode für den bis dahin vorgeschriebenen akuten Toxizitätstest mit Goldorfen (*Leuciscus idus*) für die Abwassertestung in Deutschland. Ursprünglich dient der FET der Ermittlung akuter Toxizität (=Mortalität) wassergebundener Einzelschadstoffe.

Aufgrund der besonderen Empfindlichkeit des Embryonalstadiums von Wirbeltieren ist aber auch eine umfassendere Beurteilung des Gefährdungspotenzials von Schadstoffen für Umwelt und Gesundheit möglich. Daher ist der FET auch international auf bestem Wege, als Ersatzmethode für akute Fischtests anerkannt zu werden (OECD Richtlinie in Vorbereitung).

Im wissenschaftlichen Umfeld findet der FET insbesondere in der Umweltforschung, aber auch in der Wirkstoffentwicklung großes Interesse. Das Attract-Forschungsprojekt UNIFISH untersucht die toxische Wirkung diverser Umweltschadstoffe im FET. Fernziel ist dabei, Schadstoffe anhand ihrer Wirkprofile im FET identifizierbar und populationsrelevante Langzeiteffekte vorhersagbarer zu machen. Pflanzenschutzmittel (PSM) bilden aufgrund ihrer hohen Umweltrelevanz und ihrer Wirkspezifität einen Untersuchungsschwerpunkt.

Die Umweltrisikobewertung von PSM soll den Schutz aller Populationen von Nichtzielorganismen vor schädlichen Beeinträchtigungen durch den Einsatz von PSM gewährleisten. Moderne PSM zeichnen sich durch eine geringere Breitbandtoxizität und hohe Spezifität aus. Dies reduziert akute Schadeffekte auf Nichtzielorganismen zwar deutlich, erhöht aber die Wahrscheinlichkeit subletaler und chronischer Effekte. Solche Effekte können mit den derzeit vorgeschriebenen Testverfahren der ökotoxikologischen Erstbewertung (akute und verlängerte Toxizität) aber nur schwer erfasst werden.

Projektbeschreibung

Aufgrund der Wirbeltier-relevanten Wirkmechanismen und ihrer bekannten Toxizität bei Fischen wurden Insektizide ausgewählt, um deren Wirkung auf unterschiedlichen Ebenen (Embryogenese und Morphologie, Verhalten, Genexpression) im Embryo des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) zu charakterisieren. Anhand der Wirkmuster und des Vergleichs mit den Ergebnissen von Langzeitstudien können Indikatoren für populationsrelevante Effekte identifiziert werden, die dann für ein Screening einsetzbar sind.

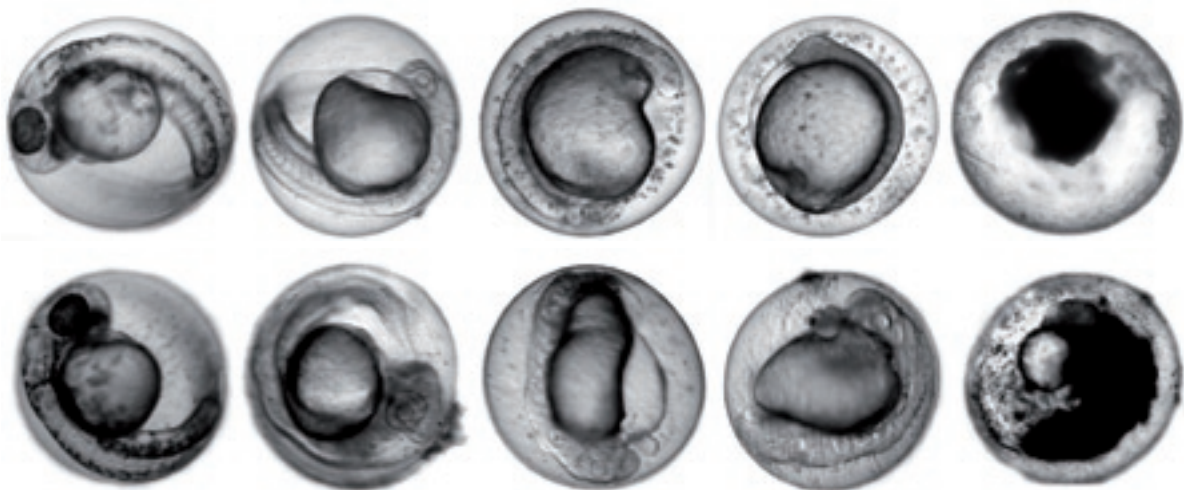
Ergebnisse

Die bisher untersuchten Insektizide induzierten alle eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der akuten Toxizität. Im subletalen Konzentrationsbereich zeigten sich unterschiedliche, teilweise Wirkmechanismus-spezifische Effektausprägungen auf morphologischer Ebene, deren Populationsrelevanz weiter untersucht werden muss. Inhibitoren des mitochondrialen Elektronentransports bewirken meist eine generelle Entwicklungsverzögerung (Figure 1, obere Reihe), Inhibitoren der nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren führen eher zu Fehlewicklungen der Wirbelsäule und des Schwanzes (Figure 1, untere Reihe). Durch eine Verlängerung der Testdauer bis nach dem Schlupf der Embryonen gelang eine deutliche Erhöhung der Sensitivität dieses Tests für die bisher getesteten PSMs (Tab. 1). Derzeit wird untersucht, in wie weit die Sensitivität und Spezifität des FETs für insektizide Wirkmechanismen durch transkriptionelle Profilerstellung (mittels Mikroarray-Analyse) erhöht werden kann.

Auftraggeber / Sponsor

Das Projekt wird durch die Fraunhofer-Gesellschaft finanziert.

Figure 1: Effects caused by increasing concentrations (left to right) of tebufenpyrad (top row) and thiocyclam (bottom row).



Background and aims

Fish are gill breathers and are therefore strongly affected by chemical pollutants in the aquatic environment. For this reason they are used as surrogates for aquatic vertebrates in environmental risk assessments. However, social and ethical concerns surrounding animal testing have led to tighter legislation, and in 2004 the fish embryo test (FET) replaced acute toxicity tests using golden orfe (*Leuciscus idus*) as the mandatory approach for waste water testing in Germany. The FET is originally used to determine the acute toxicity of chemicals but the particular sensitivity of vertebrate embryogenesis means that the test can also be used for the comprehensive assessment of toxic hazards for the environment and health. The FET is therefore increasingly becoming internationally accepted as an alternative to the acute fish toxicity test (OECD guideline in preparation). The FET's primary application is in environmental sciences but is equally useful in drug development, where it can be used to screen drugs for effect or toxicity. Within the scope of the Attract research project UNIFISH, the FET is used to study the toxic effects of diverse environmental pollutants, such as plant protection products (PPPs). The goal of these investigations is eventually to identify toxic substances based on their effect profile in the FET and their correlation to population-relevant, long-term effects.

Table 1: Effect-concentration (EC) levels at different time points during exposure to Abamectin. The EC values are expressed as the cumulative percentage of all effects: coagulation, no spontaneous movement and hatching failure. The only effect at 24h was no spontaneous movement, which is difficult to assess after 48h, when all embryos appeared phenotypically normal.

Hours post fertilization	mg/L		
	EC ₁₀	EC ₂₀	EC ₅₀
24	0.39	0.50	0.78
48	n.d.	n.d.	n.d.
72	0.17	0.20	0.30
96	0.34	0.38	0.48

The primary aim of environmental risk assessments for PPPs is to protect populations of non-target organisms from detrimental effects caused by exposure. Modern PPPs are highly specific and tend to have narrow acute toxicity ranges but this raises the probability of sublethal and chronic effects that are harder to assess with current ecotoxicological standard tests (tier 1 tests, acute and prolonged toxicity).

Project description

A number of insecticides with relevant modes of action and known toxicity to fish were tested for their effects on the development of zebrafish embryos (*Danio rerio*) at different biological levels: morphology, behavior and gene expression. A comparison of the effect patterns with the findings of long-term studies facilitates the identification of population-relevant indicators, which can then be used for screening.

Results

All the insecticides studied so far induced a concentration-dependent increase in mortality over time. However, at sublethal concentrations, diverse substance-specific morphological effects were observed, whose population-relevance has yet to be confirmed. Mitochondrial electron transport inhibitors usually cause general developmental retardation (Figure 1, top row), whereas nicotinic acetylcholine receptor inhibitors tend to induce spine and tail malformation (Figure 1, bottom row). By extending the test duration until post-hatch, we managed to increase the sensitivity of the FET significantly for PPPs (Table 1). We are now investigating whether the sensitivity and specificity for insecticidal modes-of-action can be increased further through microarray-based transcriptional profiling.

Contact / Ansprechpartnerin

Dr. Martina Fenske

Tel: +49 241 6085-12230

martina.fenske@ime.fraunhofer.de