



Die Wirkung von Pharmaka und Pestiziden einzeln und in
Kombination auf die Embryonalentwicklung des
Zebrabärblings (*Danio rerio*)

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

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

vorgelegt von
Dipl.-Biol.
Anja Kehrer

geboren am 21.04.1980, in Frankenberg

Gutachter: Prof. Dr. Roland Nagel
Prof. Dr. Isolde Röske
PD Dr. Rolf Altenburger

Tag der Verteidigung: 19.12.2008

Erythromycin für Elritzen

Experten im österreichischen Umweltbundesamt haben Gewässer auf Rückstände von Arzneimittelwirkstoffen untersucht.



Übertragung in Österreich in den Nebenflüssen der Saale. Rückstände von Arzneimittelwirkstoffen (Antibiotika, Schmerzmittel, Stoffwechsellinien, Hormonpräparate, Erythromycin, Nitroverbindungen, Neuroleptika)

Arzneimittelrückstoffe gelangen vor allem durch ihre bestimmungsgemäße Anwendung in die Umwelt. Sie werden nach dem Gebrauch in veränderte oder in Form von Umwandlungs-, Abbau- oder Reaktionsprodukten (Metaboliten) ausgeschieden und über das Abwasser in Oberflächengewässer und angrenzende Grundwasserleiter (Uferfiltrat) eingetragen.

Ob und welche Auswirkungen die Rückstände von Arzneimitteln in Gewässern auf Mensch und Umwelt haben, ist Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Für die Umweltbewertung von Humanarzneimitteln hat die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) einen Leitfaden veröffentlicht, der am 1. Dezember 2006 in Kraft getreten ist. Für die Zulassung neuer Arzneistoffe sieht dieser für Stoffkonzentrationen gleich oder über 10 ng/L in Oberflächengewässern eine weitere Untersuchung des Umweltzustands vor.

Arzneimittelrückstoffen einschätzen zu können. Unter anderem werden die Substanzen Bezafibrat, Carbamazepin, Koffein, Diclofenac, Erythromycin, Ibuprofen, Naproxen, Phenazon und Trimethoprim regelmäßig nachgewiesen.¹¹

In Gewässerproben aus der Donau sind Carbamazepin und Ibuprofen in Konzentrationen bis zu 310 ng/L¹² vorhanden.¹³ In kleineren Flüssen (Liesing, Schwechat) wurden die Antibiotika Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Erythromycin in Konzentrationen bis zu 130 ng/L¹⁴ nachgewiesen. Häufig verwendete Analgetika (Ibuprofen und Diclofenac) erreichten Werte bis zu 2,8 µg/L¹⁵, Bezafibrat (Lipidsenker) einen Spitzenwert von 3,6 µg/L.¹⁶

Grundwasseruntersuchungen, bei denen das Antiepileptikum Carbamazepin analysiert wurde, zeigten, dass 29 von 36 Messstellen unbelastet waren. 18 Messstellen wiesen Konzentrationen bis zu 10 ng/L¹⁷ auf, an innerhalb 9 Messstellen war dieser Wert überschritten.¹⁸

Mit den Auswertungen von Oberflächengewässer- und Grundwasserproben liegen Grundlagen für eine Einschätzung der Belastungssituation in der aquatischen Umwelt in Österreich vor. Für die erwählten Substanzen in Konzentrationen gleich oder über dem in dem Leitfaden der EMA festgesetzten Schwellenwert von 10 ng/L¹⁹ für Oberflächenwasser



Zunehmende Belastung

Gewässerschutz Patienten scheiden Arzneimittel wieder aus. Für Flüsse und Seen werden diese Wirkstoffe zum Problem.

Bis in die 1980er Jahre konnte man bei manchen Apothekern afrikanische Kräftlinge bewundern. Die im Volksmund auch „Apothekerfische“ getauften Tiere dienten als lebender Schwangerschaftstest: Produzierte ein Weibchen Eier, nachdem es den Morgenurin einer Frau unter die Haut gespritzt bekommen hatte, fiel der Test positiv aus.

Neuzeitung heißt die Fritsche beim Gewässerschutz. Der Biologieprofessor Werner Klaus und seine Kollegen vom Berliner Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenlimnologie arbeiten die

genam (milliometer Gramm) pro Liter. „Schuld daran ist hauptsächlich der Mensch“, sagt Privatdozent Dr. Thomas Jernes von der Bundesanstalt für Gewässerkunde in Koblenz. Patienten, die Medikamente einnehmen, scheiden einen Großteil der Wirkstoffe wieder aus. Über die Toiletenspülung gelangen diese in die Kanalisation, in die Kläranlage und weiter in flache Flüsse und Seen. „Mit der üblichen Ausstattung können Kläranlagen höchstens zehn Prozent der Wirkstoffe und deren Abbauprodukte aus dem Abwasser



Hochsensibel: Der Kräftling (links) kann Hinweise auf Hormonrückstände im Wasser geben. In Kölschen (rechts) reichern diese sich an.

Sexualhormone aus der Antibiotikapille Fichtelstüchchen verdünnen, und zwar schon in niedrigen, gewässerüblichen Konzentrationen. Andere Stoffe schädigen dagegen die Modellorganismen gar nicht oder erst in einer mehrfach höheren Dosis.

Das sei jedoch kein Grund zur Entwarnung, gibt Jernes zu bedenken: In der Natur haben wir es mit einem Gemisch aus zehntausend Tausenden von Wirkstoffen und Abbauprodukten zu tun. Und dieser Cocktail nimmt Einfluss auf höchst unterschiedliche Ökosysteme.²⁰

Gemeinsam mit Gewässerkundern, Ökotoxikologen und Mitarbeitern der Umweltämter fordert Jernes, die Arzneimittelkonzentration in Gewässern versorglich möglichst niedrig zu halten. Dazu wäre eine spezielle Technik in den Kläranlagen nötig. Mit einem

Leipziger Forscher finden Rheumamittel im Flusswasser

Pharma-Rückstände stammen offenbar aus Krankenhäusern – Elbe und Mulde mit anderen Stoffen belastet – UFZ untersucht Langzeitfolgen

VON MATTHIAS HAIBERG

Leipzig. Die Saale ist durch pharmazeutische Rückstände belastet. Bei einem Test wurden Reste des Rheumamittels Diclofenac festgestellt, informierte der Chemiker des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle (UFZ), Wolf von Tümpling.

Die Forscher gehen davon aus, dass die Chemikalien über das Klärwasser von Krankenhäusern in den Fluss gelangten. Auch andere Rückstände machen den Wissenschaftlern Sorge: Arsen in der Elbe, Insektizid-

Reste in der Mulde. Für sich genommen seien die Mengen nicht giftig, doch sei ungewiss, welche Langzeitwirkungen von ihnen ausgehen.

Es gebe Anhaltspunkte, dass auch geringe Dosen von Giftstoffen chronische Auswirkungen auf die Gesundheit von Tieren und Pflanzen und damit auf das gesamte Ökosystem haben, so UFZ-Ökotoxikologe Rolf Altenburger. Allerdings werde es nur schwer möglich sein, einem bestimmten Stoff eine spezielle Wirkung nachzuweisen. Neben der Saale haben die Forscher auch

die Elbe auf Rückstände untersucht und dabei eine erhöhte Arsenkonzentration nachgewiesen, die aus der Zeit des intensiven Bergbaus im Erzgebirge stammt. In der Mulde hat man Rückstände des ehemals in Bitterfeld in großen Mengen hergestellten Insektizids und Holzschutzmittels Lindan im Flussschlamm gefunden, das heute aber nicht mehr produziert wird.

Daneben, so die Forscher, seien es Duftstoffe aus Seifen, die bis ins Grundwasser vordringen und dort bisher kaum untersuchte Reaktionen auslösen könnten. UFZ-Biologin Kristin Schirmer: „Erste Studien haben gezeigt, dass diese Duftstoffe Zellschäden in Organismen hervorrufen können. Das Problem ist, dass sie nicht wasserlöslich sind und daher in herkömmlichen Klärwerken nicht abgebaut werden.“ Das müsse künftig bereits bei der Entwicklung solcher Substanzen berücksichtigt werden, fordert Schirmer.

Das UFZ hat zehn Millionen Euro Forschungsgelder von der EU erhalten, um solche Zusammenhänge weiter untersuchen zu können. (tdp)

Für Moritz

Die letzte Stimme, die man hört, bevor die Welt explodiert, wird die Stimme eines Experten sein, der sagt: „Das ist technisch unmöglich!“.
(*Sir Peter Ustinov, 1921- 2004*)

Danksagung

Während der Entstehung dieser Arbeit habe ich vielfältige Unterstützung von verschiedenen Personen erhalten. Ich bedanke mich dafür bei allen Beteiligten ganz herzlich.

Ich danke:

an erster Stelle Professor Nagel für die Möglichkeit, meine Arbeit am Institut für Hydrobiologie der Technischen Universität Dresden durchführen zu können. Er hatte immer Zeit für Diskussionen, meine vielen Fragen, Anregungen, aufbauende Worte und hilfreiche Kritik.

allen Gutachtern für Bereitschaft die Arbeit in so kurzer Zeit zu lesen und bewerten.

Dr. Rolf Altenburger und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe vom Department Bioanalytische Ökotoxikologie am UFZ Leipzig für die Möglichkeit meine Daten präsentieren zu dürfen, die vielen Diskussionen, sei es auf Tagungen oder am UFZ selbst, sowie die Anregungen zu den Mischungen

allen (ehemaligen und noch verbliebenen) Mitgliedern der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie für die gute Arbeitsatmosphäre. Besonders sei hier Dr. Dirk Jungmann gedankt für die moralische Unterstützung, die vielen fachlichen Ratschläge und Diskussionen sowie natürlich auch für die geduldige Erstellung der zahlreichen Graphen mit R. Des weiteren danke ich Marcus Rybicki, Susanne Siebeneicher und Manuela Barthel für die Ablenkung und die vielen Gespräche.

Dr. Michael Clevers für die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen zur Kombinationswirkung von Chemikalien.

Herrn Wagner von der Wettiner Apotheke in Brand-Erbisdorf, Frau Lesche und Frau Beyer von der Apotheke im Ärztehaus Mickten in Dresden sowie Francois Busquet für die Bereitstellung der Information zum Umgang mit den beiden Zytostatika .

Herrn Broschard von Merck für die kostenlose Bereitstellung von Bisoprolol hemifumarat.

Thomas Bretfeld und unserem Hausmeister für die Unterstützung in der Fischzucht und auch dafür, dass sie immer da waren, wenn Not am „Fisch“ war.

den Praktikanten, Cornelia Bandow und Matti Ermold, für die zeitweise Betreuung der Tiere an den Wochenenden und Feiertagen.

allen „Drudebauern/innen“ für das nette Arbeitsklima, besonders Sven Volkmann für die vielen gewonnenen Einsichten.

schließlich meinen Eltern, die wohl den größten Beitrag am Gelingen dieser Arbeit haben. Danke, dass Ihr es mir ermöglicht habt zu studieren und immer für mich da seid.

Diese Arbeit wurde im Rahmen der „Förderung des weiblichen wissenschaftlichen Nachwuchses“ durch die Technische Universität Dresden gefördert.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Poster

- Kehrer, A., Nagel, R., 2007, „The Investigation of Mixture Toxicities using the Embryotest with Zebrafish *Danio rerio* (DarT)- is it meaningful to use only Coagulated Eggs as Lethal Endpoint?“, Posterpräsentation, SETAC Europe Annual Meeting, 20.05.-24.05. 2007, Porto
- Kehrer, A., Jungmann, D., Rybicki, M., Nagel, R., 2009, „Die Wirkung von Pharmaka einzeln und in Kombination auf die Embryonalentwicklung des Zebrabärblings“, Posterpräsentation, SETAC Europe GLB Meeting, 05.10.-07.10.2009, Freising, Weihenstephan

Vortrag

- Kehrer, A., Nagel, R., 2007, Kombinationswirkung von Analgetika im Embryotest mit Zebrabärbling (*Danio rerio*): Welchen Einfluss haben die vier letalen Endpunkte auf das Ergebnis?, Vortrag SETAC GLB Tagung, 11.09.- 14.09.2007, Leipzig

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Testorganismus.....	6
2.1.1	Biologie des Zebrafischlings.....	6
2.1.2	Herkunft der adulten Tiere	8
2.1.3	Hälterung	8
2.1.4	Gewinnung der Eier	9
2.2	Die Embryonalentwicklung des Zebrafischlings.....	10
2.2.1	Stadien der Embryonalentwicklung	11
2.3	Prinzip der Methode	14
2.4	Kombinationswirkung.....	20
2.4.1	<i>Konzentrationsadditivität (CA)</i>	21
2.4.2	<i>Unabhängige Wirkung (IA)</i>	22
2.4.3	Vorgehensweise bei der Analyse von Kombinationswirkungen.....	24
2.4.4	Vorversuche zur Mischung der Analgetika.....	26
2.5	Versuchsdurchführung	27
2.5.1	Testmedium ISO-Wasser	27
2.5.2	Lösungsvermittler.....	27
2.5.3	Probenvorbereitung	28
2.5.4	Versuchsansatz	29
2.6	Analytik	31
2.7	Mess-Parameter	31
2.7.1	pH-Wert.....	31
2.7.2	Sauerstoff	32
2.7.3	Leitfähigkeit	32
2.8	Testsubstanzen	33
2.8.1	N-Acetylcystein.....	34
2.8.2	Acetylsalicylsäure	35
2.8.3	Atropin	36
2.8.4	Bezafibrat	37
2.8.5	Bisoprolol	38
2.8.6	Carbamazepin.....	39
2.8.7	Carbaryl.....	40

2.8.8	Chloramphenicol	41
2.8.9	Clarithromycin	42
2.8.10	Clenbuterol	43
2.8.11	Clofibrinsäure	44
2.8.12	Coffein	45
2.8.13	Cyclophosphamid	46
2.8.14	Diclofenac	47
2.8.15	Erythromycin	48
2.8.16	17- α -Ethinylöstradiol	49
2.8.17	Fenofibrat	50
2.8.18	Ibuprofen	51
2.8.19	Ifosfamid	52
2.8.20	Malathion	53
2.8.21	Metoprolol	54
2.8.22	Naproxen	55
2.8.23	Oxytetracyclin	56
2.8.24	Paracetamol	57
2.8.25	Parathion	58
2.8.26	Propranolol	59
2.8.27	Roxithromycin	60
2.8.28	Salbutamol	61
2.8.29	Sulfamethoxazol	62
2.8.30	Tamoxifen	63
2.8.31	Terbutalin	64
2.8.32	Theophyllin	65
2.8.33	Trimethoprim	66
2.8.34	Valproinsäure	67
2.8.35	Verapamil	68
2.9	Datenaufbereitung und Versuchsauswertung	69
2.9.1	LC ₅₀ -Bestimmung (letale Konzentration)	69
2.9.2	EC ₅₀ -Bestimmung (Effektkonzentration)	69
2.9.3	Bestimmung von NOEC und LOEC	69
2.9.4	Bestimmung LD ₅₀ *	70
2.9.5	Darstellung der Mischungstoxizität	70
2.10	Geräte und Materialien	70
2.10.1	Hälterung und Ei-Gewinnung	70
2.10.2	Ei-Entnahme und Probenansatz	71
3	Ergebnisse & Diskussion der Einzelstoffexperimente	73
3.1	Einzelsubstanzexperimente	74
3.1.1	Analgetika	74
3.1.2	Antibiotika	110
3.1.3	Antidote	134
3.1.4	Antiepileptika	146
3.1.5	β -Blocker	154

3.1.6	β- Sympathomimetika	166
3.1.7	Gemischte Stoffgruppe mit unähnlichen Wirkmechanismen.....	176
3.1.8	Lipid-Senker	196
3.1.9	Pflanzenschutzmittel	211
3.1.10	Spasmolytika	223
3.1.11	Zytostatika	233
3.2	Zusammenfassung der Einzelstoffexperimente.....	242
4	Ergebnisse & Diskussion Kombinationsexperimente	249
4.1	Mischungen der einzelnen Substanzklassen.....	249
4.1.1	Analgetika.....	249
4.1.2	Pflanzenschutzmittel (PSM).....	281
4.1.3	Mischung verschiedener Wirkstoffklassen mit unähnlichen Wirkmechanismen	289
4.2.	Multiple Mischungen.....	296
4.2.1	Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen – beobachtete Effekte.	296
4.2.2	Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen – beobachtete Effekte.	304
4.2.3	Multiple Mischungen - zusammenfassende Betrachtung.....	309
4.2.4	Mischung auf Basis der NOEC.....	316
4.3	Zusammenfassung der Kombinationsexperimente.....	321
5	Abschließende Betrachtung.....	323
6	Literatur	324
7	Anhang & Verzeichnisse.....	336
	Anhang A.....	336
	Anhang B.....	337
	Anhang C.....	374
	Abbildungsverzeichnis.....	400
	Abkürzungsverzeichnis.....	412
	Tabellenverzeichnis.....	415

1 Einleitung

Arzneimittel werden in großem Umfang in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt. Die Frage nach den Folgen des Arzneimittelkonsums für die Umwelt spielte lange Zeit keine große Rolle. Erst als Anfang der neunziger Jahre eher zufällig im Rahmen eines Routinemessprogramms für Pflanzenschutzmittel, der, dem Herbizid Mecoprop isomere Lipidsenker-Metabolit Clofibrinsäure in Berliner Oberflächen-, Trink- und Grundwasser nachgewiesen wurde und zudem ein negativer Einfluss des Schmerzmittels Diclofenac auf Geierpopulationen auf dem indischen Subkontinent gezeigt werden konnte (Oaks et al., 2004), setzte ein Umdenken ein. Nachfolgende Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich nicht nur um ein regionales Problem handelt und nicht nur Clofibrinsäure und Diclofenac in Kläranlagenabflüssen, Oberflächengewässern, Grundwasser sowie auch im Trinkwasser vorhanden sind. Insgesamt wurden bisher mehr als 100 verschiedene Pharmaka und zahlreiche Metabolite in der Umwelt, sowohl in Deutschland als auch in anderen europäischen Ländern nachgewiesen (arge-elbe, 2003, BLAC, 1999; Daughton und Ternes, 1999; Fent et al., 2006b; Halling-Sorensen et al., 1998; Sattelberger, 1999). Pharmaka sind damit in der aquatischen Umwelt nicht als vereinzelt auftretenden Verunreinigungen sondern ubiquitäre Kontaminanten anzusehen. Mit der fortschreitenden Entwicklung von Analysetechniken ist zu erwarten, dass noch weitere, der z.Zt. ca. 2900 zugelassenen Wirkstoffe in der Umwelt nachgewiesen werden (Fent et al., 2006b).

Arzneimittel sind nach dem Arzneimittelgesetz (AMG, 2008) als Stoffe oder Zubereitungen von Stoffen definiert, die dazu bestimmt sind, durch ihre Anwendung am bzw. im Körper von Mensch und Tier „*Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen*“ sowie „*Krankheitserreger, Parasiten oder körperfremde Stoffe abzuwehren, zu beseitigen oder unschädlich zu machen*“. Diese chemisch sehr diversen Substanzen werden gezielt als Stoffe mit biologischen Wirkungen entwickelt (Bound und Voulvoulis, 2005; Fent et al., 2006b; Engelmann et al., 2005; Halling-Sorensen et al., 1998; Liebig, 2005; Stroh, 2005). Um im Körper die gewünschte Wirkung hervorrufen zu können besitzen die Substanzen bestimmte Stoffeigenschaften, die sie zu einem Risiko für die Umwelt werden lassen. Sie sind zum einen biologisch wirksam; lange stabil und lagerfähig, zum anderen aber auch stabil gegen Enzyme und sauren pH sowie gut wasserlöslich. Sie besitzen jedoch auch eine gewisse Lipophilie, um Membranen passieren zu können (Halling-Sorensen et al., 1999). Aufgrund dieser Eigenschaften kann man davon ausgehen, dass Arzneimittel in der Umwelt bioakkumulieren und Effekte auf „non-target“-Organismen wahrscheinlich sind (Boxall, 2004; Engelmann et al., 2005; Halling-Sorensen et al., 1998; Stroh, 2005). Im Gegensatz zu Pestiziden, die periodisch zum Einsatz kommen, werden Arzneimittel zudem kontinuierlich in die Umwelt eingetragen (Boxall, 2004). Die Frachten sind dabei ähnlich, tendenziell wohl aber größer als die von Pflanzenschutzmitteln (arge-elbe, 2003; BLAC, 1998; Stroh, 2005).

Nach der Einnahme bzw. Verabreichung gelangen Pharmaka oder ihre Abbauprodukte über verschiedene Eintragspfade in die aquatische Umwelt (Abbildung 1-1), wobei diese für Human- und Veterinärpharmaka verschieden sind (Stroh, 2005).

Humanpharmaka gelangen zum einen über die natürlichen Ausscheidungen wie Urin und Faeces in das Abwassersystem und können nach der Passage der Kläranlagen, in denen sie z.T. nicht oder nur unvollständig eliminiert werden, über die Vorfluter in Oberflächengewässer gelangen (Bound und Voulvoulis, 2005; Fent et al., 2006b; Ternes, 2000). Zum anderen kommen einige Substanzen wie z.B. Diclofenac oder Oxytetracyclin (Oxytetracyclin-Augensalbe, JENAPHARM, 2005) auch als Inhaltsstoffe von Salben zur äußerlichen Anwendung und können somit direkt über das Abwaschen der Haut ins Abwasser eingetragen werden (Ternes, 2000). Einen weiteren wichtigen Eintragspfad von Arzneimitteln ins Abwasser stellt die unsachgemäße Entsorgung über die Toilette dar. Auch so können die Substanzen über die kommunalen Kläranlagen, sofern in dieser nicht abgebaut werden, in die Vorfluter und damit in die Oberflächengewässer gelangen (Bound und Voulvoulis, 2005; Engelmann et al., 2005; Stroh, 2005; Ternes, 2000).

Ein mögliches Kontaminationsrisiko für das Grundwasser ergibt sich durch die Infiltration von belastetem Oberflächenwasser in den Untergrund sowie durch Leckagen in den Abwasserleitungssystemen. Zudem kann auch die unsachgemäße Entsorgung von Medikamenten in den Hausmüll durch Undichtigkeiten von Deponien über Sickerwasser zu einer Belastung des Grundwassers führen (Bound und Voulvoulis, 2005; Stroh, 2005; Ternes, 2000).

Wie Veterinärpharmaka in die Umwelt gelangen, hängt zum einen davon ab, wie das Tier den Stoff verabreicht bekommt. Wird dem Tier das Pharmakon topisch appliziert, so kann es auch hier zum einem „wash-off“ kommen, ähnlich der Anwendung von Salben in der Humanmedizin. Applikationen erfolgen aber auch über das Futter, als Injektion oder als Bolus. Zum anderen sind auch die Umstände der Tierhaltung ein wichtiger Punkt (Boxall et al., 2003). Durch Veterinärpharmaka und Futtermittelzusatzstoffe ist mit dem Ausbringen belasteter Gülle auf Felder, im Gegensatz zu den Humanpharmaka, insbesondere mit einer Boden- und Grundwasserbelastung zu rechnen. Daraus ergibt sich ein weiteres Problem. Nach Starkregenereignissen können durch Abschwemmungen („run-off“) der landwirtschaftlich genutzten Flächen beträchtliche Mengen der belasteten Gülle-Inhaltsstoffe, aber auch von wiederverwendetem Klärschlamm in die Drainagen und von dort in die Oberflächengewässer gespült werden (Fent et al., 2006b; Stroh, 2005; Ternes, 2000). Zudem scheint auch ein Eintrag in Form von Aerosolen und Stäuben denkbar zu sein (Boxall, 2003).

Einen Sonderfall stellt die Verwendung von Medikamenten in Aquakulturen dar. Antibiotika oder Antiwurmmittel werden dabei in der Regel direkt ins Hälterungswasser gegeben, welches häufig ohne weitgehende Behandlung in Oberflächengewässer eingeleitet wird (Boxall et al., 2003; Boxall, 2004; BLAC, 1998; Fent et al., 2006; Stroh, 2005; Ternes, 2000).

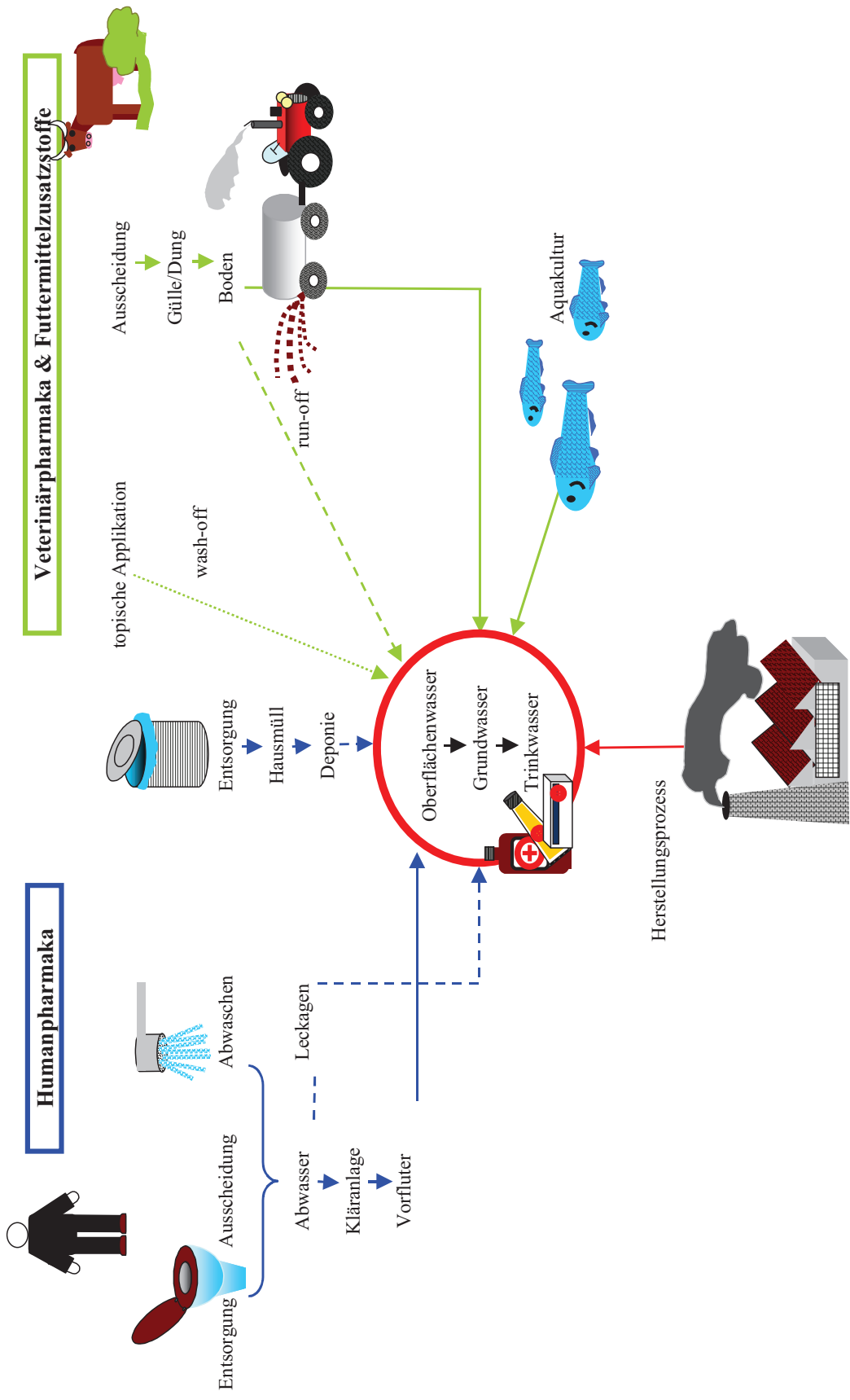


Abbildung 1-1: Eintragspfade von Human- und Veterinärpharmaka in die aquatische Umwelt (verändert nach Stroh, 2005).

Neben diesen eher diffusen Einträgen, die aus der Verwendung von Human- und Veterinärarzneimitteln herrühren, können Abwässer der Arzneimittelproduktion zu einem punktuellen Eintrag der Pharmaka in die als Vorfluter genutzten Fließgewässer führen. (Boxall et al., 2003; Boxall, 2004; BLAC, 1998; Daughton und Ternes, 1999; Engelmann et al., 2005; Fent et al., 2006; Ternes, 2000).

Nach dem Eintrag in die Umwelt werden die Arzneimittel in den unterschiedlichen Umweltkompartimenten Luft, Wasser, Boden oder Sediment verteilt. Eine Reihe von Faktoren, wie z.B. die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen (Wasserlöslichkeit, $\log K_{ow}$ etc.) und die Eigenschaften, der die Stoffe enthaltenden Umgebung beeinflussen dabei die Verteilung (Boxall, 2004). In verschiedenen Studien wurden Arzneimittelkonzentrationen im Bereich von wenigen ng/L bis zu mehreren $\mu\text{g/L}$ in der Umwelt nachgewiesen (Ternes, 1998 & 2000; BLAC, 2003; Liebig, 2005), wobei die Konzentrationen im Abwasser am höchsten sind. Neben der Verdünnung des Abwassers, der angewendeten Klärtechnik und der Abbaubarkeit der Substanzen hat auch der saisonal und regional unterschiedliche Medikamentenverbrauch einen Einfluss auf die Rückstandskonzentrationen (Fent et al., 2006). Die Konzentrationen der Arzneimittel im Oberflächenwasser sind außerdem abhängig vom Abwasseranteil und damit auch von der Besiedlungsdichte.

Unter den im Wasser enthaltenen Stoffen ist die Gruppe der synthetischen Steroidhormone als besonders problematisch einzustufen, die bereits in geringsten Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Reproduktion und die Geschlechtsdifferenzierung von Organismen haben können (Fent et al., 2006).

Aufgrund der geringen gefundenen Konzentrationen ist nach Boxall (2004) davon auszugehen, dass die indirekte Exposition des Menschen gegenüber Arzneimitteln über das Trinkwasser bzw. die Wasserversorgung allgemein kein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellt. Jedoch sind seiner Meinung nach andere Expositionspfade, wie z.B. die Aufnahme der Substanzen aus dem Boden (z.B. in Getreide) und eine weitere Biomagnifikation über die Nahrungskette noch nicht untersucht worden und können daher auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Der Mensch scheint allerdings nicht unmittelbar gefährdet zu sein.

Der Einfluss dieser Stoffe auf die Umwelt ist indes schwerer abzuschätzen. Pharmaka zählen zwar zu den toxikologisch bestuntersuchten und charakterisierten Substanzen, doch trotz ihres intensiven Einsatzes sind bisher die Konsequenzen des Eintrages in die Umwelt und die damit verbundene geringe, jedoch permanente Exposition von „non target“-Organismen gegenüber Arzneimitteln ökotoxikologisch weit weniger gut untersucht (Boxall, 2004; BLAC, 2003; Cleuvers, 2003, 2004, 2005; Fent et al., 2006; Ferrari et al., 2003; Löffler et al., 2005; Stroh, 2005), da erst seit Mitte der neunziger Jahre im Rahmen des Zulassungsverfahrens für Arzneimittel die Umweltprüfung vorgeschrieben ist (Rönnefahrt et al., 2002).

Da diese Stoffe v.a. in der Therapie von Wirbeltieren eingesetzt werden und mögliche toxische Wirkungen auf aquatische Vertebraten wie Fische oder andere „non-target“-Organismen so gut wie nicht untersucht sind, sind aufgrund der spezifischen biologische Wirkungen eine Vielzahl unerwünschter und z.T. noch völlig unbekannter Nebenwirkungen möglich.

Wenn in der Literatur Daten zu Ökotoxizität vorhanden sind, so sind bisher meist nur Einzelstoffe untersucht worden. In der Realität sind allerdings Arzneimittel nicht die einzigen Kontaminanten eines Ökosystems. Aquatische (und auch terrestrische) Organismen sind gegenüber Mischungen aus Pharmaka und anderen Substanzen, wie z.B. Pestiziden und Industriechemikalien, der sogenannten komplexen Matrix exponiert (Boxall, 2004; Bound und Voulvoulis, 2005; Cleuvers, 2003, 2004, 2005; Fent et al., 2006). Dabei können Effekte wie Antagonismus bzw. Additivität und Synergismus im Vergleich mit der Toxizität des Einzelstoffes zu einem Ab- bzw. Anstieg der zu beobachteten Effekte führen (Boxall et al., 2003; Cleuvers, 2003).

Eine Reihe von Substanzen wurden bisher in marinen und limnischen Gewässern nachgewiesen (Bound und Voulvoulis, 2005; Boxall, 2004; Ternes, 2000). Zu den häufigsten detektierten Indikationsgruppen gehören Analgetika, Lipidsenker, Antiepileptika, Antibiotika sowie β -Blocker, β -Sympathomimetika; Zytostatika und hormonell wirksame Arzneistoffe, auch konnte Coffein in einer Reihe von Gewässerproben nachgewiesen werden (arge-elbe, 2003; Boxall, 2004; Cleuvers, 2003, 2004, 2005; Daughton und Ternes, 1999; Fent et al., 2006; Moore et al., 2008; Sattelberger, 1999; Stroh, 2005, Ternes, 1998).

Aufgrund der geschilderten Problematik wurden in der vorliegenden Arbeit eine Reihe von Arzneimitteln sowie drei Pflanzenschutzmittel im Embryotest mit dem Zebraabärbling (*Danio rerio*, *DarT*) untersucht. Dieses Modell, das von Schulte & Nagel (1994) als Alternativmethode für den akuten Fischtest nach OECD 203 (OECD, 1992) entwickelt wurde, bietet den Vorteil neben letalen auch verschiedene subletale Effekte erfassen zu können, die einen Hinweis auf den Wirkmechanismus der untersuchten Substanz geben können. So konnte Zeller (1995) zeigen, dass *DarT* für die Erfassung der Effekte herzwirksamer Pharmaka geeignet ist. Bachmann (2002) zeigte die Eignung des Testsystems für die Erfassung teratogener Effekte von Substanzen. Maiwald (1997) und Schulte (1997) konnten die Eignung für die Erfassung pigmentverändernder Effekte von Substanzen nachweisen. Aufgrund der Testdauer von nur 48 Stunden war es zudem möglich eine größere Anzahl von Stoffen untersuchen zu können.

Die Auswahl der zu untersuchenden Stoffe richtete sich nach verschiedenen Kriterien. Zum einen sollten in der Literatur ihre Wirkmechanismen zumindest für den Säuger gut beschrieben sein, wobei sowohl Substanzen ähnlicher als auch unähnlicher Wirkmechanismen ausgewählt wurden. Zum anderen sollten sie eine gewisse Umweltrelevanz besitzen, d.h. sie sollten entweder auf der Prioritätenliste des österreichischen Umweltbundesamt (Sattelberger, 1999) vertreten oder in Umweltproben nachgewiesen worden sein.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Wirkung der Pharmaka auf die Embryonalentwicklung des Zebraabärblings sowie die Untersuchung ihrer Kombinationswirkung.

2 Material und Methoden

2.1 Testorganismus

2.1.1 Biologie des Zebrabärblings

Die vorgestellten Untersuchungen wurden an befruchteten Eiern des Zebrabärblings (*Danio rerio*; [Hamilton-Buchanan, 1822], Weiss, 1983) durchgeführt. Es soll im Folgenden ein Einblick in die Biologie des Testorganismus gegeben werden.

Danio rerio ist ein limnischer Warmwasserfisch (Weiss, 1983) der sich innerhalb der Vertebraten wie folgt taxonomisch einordnen lässt:

Klasse:	Osteichthyes (Knochenfische)
Unterklasse:	Actinopterygii (Strahlenflosser)
Überordnung:	Teleostei (Knochenfische i.e.S ¹ .)
Ordnung:	Cypriniformes (Karpfenartige)
Unterordnung:	Cyprinoidei (Karpfenfische)
Familie:	Cyprinidae (Weissfische)

Die Wildform dieser oviparen Art (Hisaoka und Battle, 1958; Laale, 1977) wurde erstmals 1905 durch Paul Matte aus Indien eingeführt (Weiss, 1983). Ursprünglich sind die Zebrabärblinge in den warmen Gewässern des östlichen Vorderindiens, Bengalens und Bangladeschs, wie Ganges oder Brahmaputra, beheimatet (Eaton and Farley, 1974; Laale, 1977; Weiss, 1983). Die meisten Bärblinge leben in den obersten, offenen Wasserschichten. Unter Pflanzen oder am Boden finden sich die Tiere meist nur bei der Balz oder zur Futtersuche (Schäfers et al., 1989). Zebrabärblinge sind omnivor (Laale, 1977). Nach Schäfers (1988) sind sie typische Freiwasserjäger und ernähren sich u.a. von planktischen Tieren (Maiwald, 1997). Eigenschaften, wie eine fehlende individuelle Bindung, Gruppenbildung in ungewohnten Situationen oder fehlendes Konkurrenzverhalten klassifizieren *Danio rerio* als Schwarmfisch (Schäfers et al., 1989; Weiss, 1983).

Zebrabärblinge werden 3 bis 5 cm groß und gedeihen sowohl in weichem als auch in hartem Wasser (Eaton und Farley, 1974; Nagel, 2002), wobei Wassertemperaturen zwischen 20 und 28°C gut toleriert werden (Laale, 1977; Nagel, 2002; Roosen-Runge, 1938; Westerfield, 1995; Weiss, 1983).

Die Weibchen werden etwas größer als die männlichen Tiere und weisen auch außerhalb der Laichzeit ein dickeres Abdomen als die Männchen auf (Eaton und Farley, 1974; Laale, 1977; Weiss, 1983; Wixon, 2000, Abbildung 2-1). Die Geschlechter sind ferner farblich

¹ im engeren Sinn

zu unterscheiden, wobei die Streifen zwischen den dunklen Längsbinden bei den Männchen goldgelb und bei den Weibchen silberweiß sind (Weiss, 1983; Wixon, 2000, Abbildung 2-1).

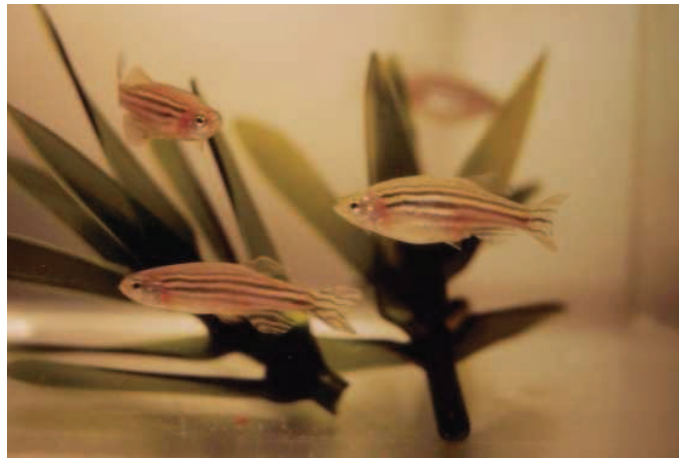


Abbildung 2-1: Zwei Männchen und ein Weibchen (Hertl, 1992).

Schäfers et al. (1989) ordnen diesen Fisch als r-Strategen ein, mit einer hohen Reproduktionsrate und wenig Investition von Energie in die einzelnen Nachkommen.

Während der ganzjährigen Reproduktion beginnt die Balz stets in der Dämmerung bei Sonnenaufgang (Eaton und Farley, 1974). Dabei verfolgen meist mehrere Milchner² ein Weibchen und drängen es an den Boden oder an geeignete Substrate, z.B. Pflanzen. Jeweils ein Männchen umschlingt ein Weibchen, welches in einer ähnlichen Bewegung die Eier abgestreift, die von dem Männchen befruchtet werden. Ein Rogner³ legt bei einem Laichvorgang zwischen 100 und 500 Eiern ab (Zeller, 1995), welche transparent sind und nicht kleben (Laa-le, 1977; Roosen-Runge, 1938; Schäfers et al., 1989). Die Dauer des Laichzyklus variiert in Abhängigkeit von der Wassertemperatur zwischen zwei und fünf Tagen (Nagel, 1986), auch scheint das Alter der Tiere einen Einfluss darauf zu haben (Eaton und Farely, 1974). Die Eier besitzen einen mittleren Durchmesser von ca. 0,7 mm und ein durchschnittliches Gewicht von 0,67 mg (Ensenbach, 1987). Die externe Befruchtung erlaubt den einfachen Zugriff auf die Eier für Beobachtungen und Untersuchungen oder auch für Manipulationen (Lele und Krone, 1996; Wixon, 2000). Zu beachten ist dabei, dass Zebrabärblinge Laichräuber sind (Westerfield, 1995).

Die Entwicklung der transparenten Eier bzw. Embryonen kann unter dem Mikroskop verfolgt werden und verläuft sehr schnell (in 2 bis 4 Tagen), mit einem schlagenden Herz und flotierenden Erythrozyten nach 24 Stunden (Wixon, 2000). Der Schlupf erfolgt in Abhängigkeit von der Temperatur nach ca. 72 bis 96 Stunden. Bei 26°C wächst der junge Zebrafisch rasch heran und erreicht die Geschlechtsreife mit etwa 3 Monaten (Nagel, 2002).

Aufgrund der problemlosen Hälterung ist er heute ein beliebter Aquarienfisch und ein bevorzugtes Modell in der Ökotoxikologie. Er wird zudem auch eingesetzt um die Entwick-

² Bezeichnung für die männlichen Fische

³ Bezeichnung für die weiblichen Fische

lung der Vertebraten zu studieren (Lele und Krone, 1996; Wixon, 2000). Ebenso erfolgreich werden mit dieser Art die Entwicklung verschiedener Gewebekomplexe wie der Niere, des olfaktorischen oder des visuellen Systems sowie der Hämatopoese untersucht, wobei Mutanten dieser Fischart auffallend ähnliche Phänotypen aufweisen wie sie bei menschlichen Erkrankungen auftreten (Wixon, 2000). Er findet daneben auch Anwendung in der Genetik (Genom: 1700 Mb; 25 Chromosomen; Wixon, 2000), Entwicklungsbiologie und Toxikologie (Eaton and Farley, 1974; Herrmann, 1993; Lele und Krone, 1996).

2.1.2 Herkunft der adulten Tiere

Die verwendeten Tiere stammen aus Nachzuchten vom WIK⁴-Stamm des Max-Planck-Institutes Dresden für molekulare Zellbiologie und Genetik. Es handelt sich dabei um einen reinen Inzucht-Stamm, so dass auch die vereinzelt bei nicht-exponierten Embryonen (Kontrollembryonen) beobachtete fehlende bzw. reduzierte Pigmentierung oder Deformationen an Schwanz oder Wirbelsäule möglicherweise darauf zurückzuführen sein könnten. Bei vermehrtem Auftreten solcher, möglicherweise inzuchtbedingter Deformationen an den adulten Zuchttieren sowie nachlassender Reproduktion wurden die adulten Fische durch eine eigene, optisch intakte Nachzucht ersetzt.

2.1.3 Hälterung

Die adulten Fische wurden nach Nagel (1986) in Zuchtgruppen im Geschlechterverhältnis von etwa einem Weibchen zu zwei Männchen gehalten, wobei die Hälterung in 96- bzw. 120L-Glasaquarien im Durchflusssystem erfolgte. Männchen und Weibchen wurden kontinuierlich zusammen gehalten, da Eaton und Farley (1974) sowie Nagel (1986) zeigen konnten, dass dann die höchsten Eizahlen erhalten werden. Auch hat dies positive Auswirkungen auf die Eiqualität (Nagel, 1986). Die Raum- und Wassertemperatur wurden konstant auf 26°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) gehalten. Es wurden Außenfilter mit zwei Filtermedien (Tonmaterial und Filterschwamm) verwendet. Das Lichtregime war über Zeitschaltuhren auf 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkel eingestellt. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich (9.00 und 16.00 Uhr), wobei handelsübliches zerriebenes Zierfischtrockenfutter über Futterautomaten verabreicht wurde. Die abgegebene Menge richtete sich dabei nach der Besatzdichte und sollte innerhalb von zwei Stunden aufgefressen worden sein. Zusätzlich wurden einmal am Tag *ad libidum Artemia salina*-Nauplien gefüttert. Die Reinigung der Glasaquarien erfolgte einmal täglich, wobei Algen, Fäces und Futterreste entfernt wurden. Die Glasaquarien waren mit Glasplatten abgedeckt, so dass die Fische nicht aus den Becken springen konnten (siehe dazu auch Günther, 1987). Die physikalisch-chemischen Wasserparameter, wie Sauerstoffsättigung,

⁴ WIK: WildtypeKalkutta

pH-Wert, Nitrat- (NO_3) und Nitrit-Gehalt (NO_2) sowie Gesamthärte (GH) und Carbonathärte (CH) wurden stichprobenartig mittels Teststreifen und Test Kits untersucht (2.10.1).

Eine detaillierte Beschreibung der Hälterung der adulten Tiere des Instituts für Hydrobiologie der TU Dresden findet sich in Kehler (2004), eine allgemeine Einführung in die Hälterung und Zucht von *Danio rerio* in Westerfield (1995)

2.1.4 Gewinnung der Eier

Zur Eigewinnung wurden in die Hälterungsbecken am Vorabend des geplanten Versuches nach der letzten Fütterung zwei Laichschalen eingestellt. Da adulte Zebrabärblinge starke Laichräuber sind, welche die abgelegten Eier in der Regel sofort fressen (Westerfield, 1995), wurden die Laichschalen mit Edelstahleinsätzen (Maschenweite ca. 3 mm) versehen, in denen sich Pflanzenimitate aus Glas oder Plastik als Ablaichsubstrat befanden. Die abgelaichten Eier fielen durch die Maschen des Gitters und waren vor dem Fraß durch die adulten Zebrabärblinge geschützt (Abbildung 2-2).



Abbildung 2-2: Laichschale mit Abdeckgitter und Laichsubstrat aus Plastikbäumchen.

Das Einschalten des Lichtes am nächsten Tag simulierte die Dämmerung und führte zum Beginn der Balz, wobei mehrere Männchen ein Weibchen vor sich her und zwischen die Pflanzenimitate trieben. Das Weibchen laichte dabei ab und die Eier wurden von den Männchen befruchtet. Die Eier sanken dann durch die Maschen des Edelstahlgitters in die Schale ab. Die Laichschalen wurden nach etwa 30 Minuten aus den Aquarien entfernt, da sowohl Eaton und Farley (1974) als auch Schäfers et. al (1989) beschreiben, dass Balz und Ablichten nach dieser Zeit beendet sind. Auch sollte so eine möglichst frühzeitige Exposition gewährleistet werden.

Die Drahteinsätze mit den Pflanzenimitaten wurden abgenommen und der Inhalt der Laichschalen über ein handelsübliches Haushaltssieb (Abbildung 2-3) gegeben, um die Eier

zurückzuhalten. Die Laichschale wurde mehrfach mit Hälterungswasser gespült. Nachdem dies geschehen war, wurden die im Sieb zurückgehaltenen Eier ebenfalls mehrfach mit Hälterungswasser gespült, um anhaftende Fäces und Schmutzstoffe zu entfernen. Anschließend wurden sie in eine Flachbodenschale mit ISO-Wasser überführt.



Abbildung 2-3: Haushaltssieb und Flachbodenschale.

Am Abend, nach der letzten Fütterung, wurden die Laichschalen wieder in die Becken eingesetzt, um die Tiere an einen regelmäßigen Tagesablauf und Ablaichrhythmus zu gewöhnen. Nach Nagel (1986) und Maiwald (1997) kann sonst ein Laichstau der Weibchen eine mögliche Folge sein.

2.2 Die Embryonalentwicklung des Zebrabärblings

Um die verschiedenen letalen und subletalen Effekte (2.3), die eine Substanz oder Substanzkombination an Embryonen hervorrufen kann, beurteilen zu können, ist die Kenntnis der normalen Ontogenese unabdingbar. Es soll daher im folgenden Kapitel die Embryonalentwicklung, wie sie bei einer Temperatur von 26°C abläuft, im zeitlichen Verlauf kurz dargestellt werden. Es wird dabei besonders auf die Parameter eingegangen, die als toxikologische Endpunkte ausgewählt wurden (2.3). Detaillierte Darstellungen finden sich in der Literatur (Hisaoaka & Battle, 1958; Laale, 1977; Kimmel et al., 1995; Sander, 1983; Roosen-Runge 1938).

Die im Folgenden dargestellten Stadien beziehen sich im Wesentlichen auf Hisaoaka und Battle (1958) sowie auf Kimmel et al. (1995). Letztere teilen die Embryonalentwicklung des Zebrabärblings in sieben Phasen ein: Zygote, Teilungsstadien, Blastula, Gastrula, Segmentation, Pharyngula und Schlupf.

2.2.1 Stadien der Embryonalentwicklung

Die Eier des Zebrafischs sind telolecithal, d.h. sehr dotterreich. Die Furchungen verlaufen discoidal und meroblastisch, wobei das Dotter nicht mit in die Furchung einbezogen wird (Laale, 1977).

Kurz nach der Ablage haben die Eier einen Durchmesser von ca. 0,65 bis 0,75 mm und sind von einer 1,5 bis 5 μm dicken Vitellinmembran, dem Chorion, umgeben, welches aus drei Schichten aufgebaut ist (Hart und Yu, 1980; Bachmann, 2002; Schulte, 1997). Die äußerste Schicht ist homogen aufgebaut, wohingegen die beiden inneren Schichten von Poren durchsetzt sind (Bachmann, 2002; Nagel, 1988). Durch den Kontakt mit dem Außenmedium kommt es zur Eiaktivierung. Die zwischen dem Chorion und der Plasmamembran, im Cytoplasma lokalisierten corticalen Granulae brechen dabei auf und geben ihren Inhalt in den Perivitellinraum ab (Corticalreaktion). Dieser entsteht, da das Chorion anschwillt und sich vom frisch abgelaichten Ei abhebt (Hart und Yu, 1980; Bachmann, 2002; Schulte, 1997). Eiaktivierung und Cortikalreaktion finden unabhängig von einer Befruchtung statt. Daher kann auch bei unbefruchteten Eiern noch die erste Teilung stattfinden (Bachmann, 2002)

Die Embryonalentwicklung beginnt mit der Befruchtung der Eizelle durch das Spermium. Die mehrschichtige Eihülle der Teleostei ist jedoch relativ stabil und kann von den Spermatozoen nicht einfach durchdrungen werden. Das Chorion besitzt deshalb am animalen Pol eine kleine Öffnung, die Mikropyle (Bachmann, 2002). Dabei handelt es sich um einen Kanal von etwa 2 μm Durchmesser (im unaktivierten Ei), durch den das Spermium eindringen und die Befruchtung stattfinden kann. Jedoch kommt es bereits nach 60 Sekunden zur Anlagerung von Material an den Innenkanal der Mikropyle, sodass keine weiteren Spermien mehr eindringen können und bei befruchteten Eiern ein Block gegen Polyspermie erreicht wird. Eine Befruchtung ist somit nur innerhalb der ersten Minute nach Eiaktivierung möglich. Bei erfolgter Befruchtung verschmilzt der Kopf des Spermiums mit der Plasmamembran der Eizelle und ein Befruchtungshügel entsteht. Etwa drei Minuten nach der Eiaktivierung ist nur noch das Flagellum des Spermiums sichtbar, der Befruchtungshügel ist verschwunden (Schulte, 1997). Das Ei tritt mit der Befruchtung in das Zygoten-Stadium ein (Kimmel et al., 1995, Abbildung 2-4a). Die nachfolgende Entwicklung ist in Tabelle 2-1 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2-1: Stadien der Embryonalentwicklung von *Danio rerio*.

Zeit [h]	Stadium	Charakteristik
0	Zygote	1-Zellstadium, Zytoplasma strömt zum animalen Pol und akkumuliert dort, Formung der Keimscheibe (Abbildung 2-4a)
0,5-2	Teilungen	2-bis 256-Zellstadium, Furchung der dotterfreien Keimscheibe in etwa 15 min-Intervallen (Abbildung 2-4b-e)
2-4	hohe Blastula	vielzelliges Blastoderm sitzt am animalen Pol dem Dotter auf, flacht sich im Laufe der weiteren Entwicklung ab (Abbildung 2-4f)
4-12	Gastrulation	Blastoderm umwächst das Dotter (Epibolie)
8		Dotter zu etwa 50% umwachsen (Abbildung 2-4g)
12		Dotter fast vollständig umwachsen (Abbildung 2-4h), der Blastoporus wird geschlossen
12-24	Segmentation	Somiten ⁵ entwickeln sich, Kopf-, Schwanzknospe und Chordanlage werden sichtbar, Kopfknospe erscheint durch entstehende Gehirnanlage deutlich dicker, Längenwachstum setzt ein, Beginn der Spontanbewegungen, Ausbildung der Sacculi und Augenanlage (Abbildung 2-4i, j)
24-72	Pharyngula	Zahl der Somiten nimmt zu, Längenwachstum, Entwicklung der Pigmentierung und Otolithen sowie des Kreislaufsystems,
24		mehr als 20 Somiten sind ausgebildet, durch das Längenwachstum löst sich der Schwanz vom Dotter, intensiver werdende Spontanbewegungen, Linsen der Augenanlage werden erkennbar, Herz wird in den Wandschichten des Dotters gebildet (Abbildung 2-4k)
36		Verlagerung des Herzens aus den Wandschichten des Dottersackes unter den Kopf, beginnende Kontraktionen, Pigmentierung der Retina, Blutkreislauf setzt ein, paarige Otolithengranula werden in den Sacculi sichtbar, Bildung der Rückenflosse
48		Pigmentierung greift auf Kopf, Dotteroberfläche und schließlich den Schwanz über, wobei sich die sternförmigen Melanophoren in den charakteristischen Längsstreifen anordnen, regelmäßiger Herzschlag, Herzschlagfrequenz zwischen 140 und 160 Schlägen/min, starker Blutkreislauf, Spontanbewegung bis auf wenige, unregelmäßige aber kraftvolle Kontraktionen reduziert (Abbildung 2-4l)
72-96	Schlupf	

⁵ Somiten: Ursegmente mesodermalen Ursprungs die sich in ihrer Entwicklung hauptsächlich zur Dorsalmuskulatur differenzieren werden

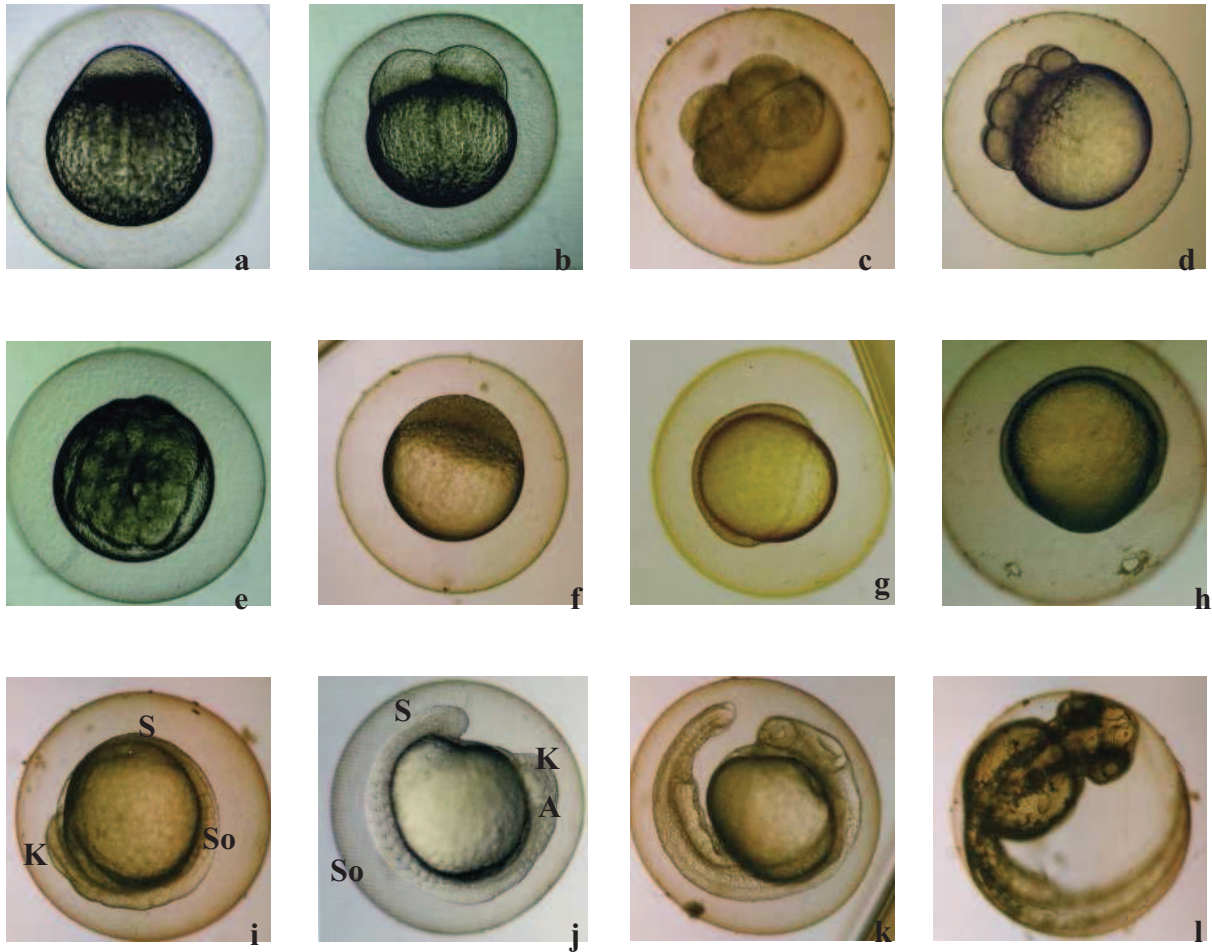


Abbildung 2-4: Stadien der normalen Embryonalentwicklung: a) Zygote; b) 2-Zellstadium; c) 4-Zellstadium; d) 8-Zellstadium; e) 16-Zellstadium; f) hohe Blastula, etwa 4 Stunden nach der Befruchtung; g) Gastrulation, Dotter zu etwa 50% umwachsen, ca. 8 Stunden nach der Befruchtung; h) Gastrulation, etwa 100% Epibolie, ca. 12 Stunden nach der Befruchtung i) etwa 9-Somiten-Stadium; j) etwa 12-Somiten-Stadium; k) Embryo 24 h nach der Befruchtung; l) Embryo 48 h nach der Befruchtung (A: Augenanlage; K: Kopfanlage, S: Schwanzanlage; So: Somiten; Abbildungen 5 a, b, e aus Richter, 1999).

Der Embryo erreicht das Schlupf-Stadium. Die Embryonalentwicklung dauert bei 26°C etwa 96 Stunden (Laale, 1977; Hisaoka & Battle, 1958). Der Schlupfzeitpunkt variiert dabei von Embryo zu Embryo und ist abhängig vom Milieu (z.B. dem pH-Wert oder der Schadstoffbelastung) sowie von der mechanischen Belastung des Chorions, z.B. durch Mikroorganismen und Schnecken (Schäfers et al., 1989).

2.3 Prinzip der Methode

Der Test wurde nach dem Verfahrensvorschlag Nagel (1998) durchgeführt. Es wurden die Auswirkungen verschiedener Pharmaka, Pestizide und Kombinationen der genannten Stoffgruppen auf die Embryonalentwicklung des Zebraärlings (*Danio rerio*) untersucht. Es wurden jeweils mindestens fünf Konzentrationen einer Substanz bzw. Substanzkombination getestet. In jeder Konzentration wurden 20 befruchtete Embryonen exponiert, wobei die Exposition in 24-Multiwellplatten erfolgte. Pro Konzentration dienten vier Embryonen in ISO-Wasser (2.5.1) als interne Kontrollen.

Die Entwicklung der exponierten Embryonen wurde zu bestimmten Zeitpunkten mit den Kontrollen verglichen. Dabei wurde das Auftreten verschiedener letaler und subletaler Endpunkte untersucht. Es wurde in einer Ja-Nein-Entscheidung festgestellt, ob ein bestimmter toxikologischer Effekt aufgetreten war und LC_x -, EC_x - Werte bzw. NOEC und LOEC bestimmt (2.9).

Die Unterscheidung von letalen und subletalen Effekten erfolgte nach Schulte und Nagel (1994). Die Autoren beschreiben vier unterschiedliche letale Endpunkte: koagulierte Embryonen, fehlende Somitenanlage, fehlende Schwanzablösung vom Dotter sowie fehlender Herzschlag (Tabelle 2-2). Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass Embryonen mit diesen Effekten weder schlüpfen noch überleben werden (Nagel, 1998; Vobach und Kammann, 2003; DIN 38415-6), was bei der Anwendung des *DarT* als Ersatzmethoden für den akuten Fischtest nach OECD 203 von Bedeutung ist. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass es für bestimmte Fragestellungen, wie z.B. bei der Untersuchung von teratogenen Effekten von Chemikalien, bei der ein Vergleich der Daten mit den LD_{50} -Daten aus Säugertoxizitätstests erfolgt (Bachmann, 2002) sinnvoll ist, sich nur auf die koagulierten Embryonen zu beschränken, da die übrigen drei Parameter bereits einen Hinweis auf den Wirkmechanismus der Testsubstanz geben können. Da der Wirkmechanismus von Substanzen auch bei der Untersuchung der Kombinationswirkung von Chemikalien von Bedeutung ist, wurden für die Substanzklasse der Analgetika sowohl bei den Einzelsubstanzen als auch bei den Mischungen zwei unterschiedliche Ansätze untersucht. In einem Ansatz wurden alle vier, in Tabelle 2-2 dargestellten Endpunkte als letal gewertet. In einem zweiten Ansatz wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen für die Berechnung der LC_{50} herangezogen. Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse für die Mischungen (3.2.1.1) wurde für die übrigen Substanzen die Festlegung getroffen, nur die koagulierten Embryonen als letal zu werten, um einen einheitlichen Bezugspunkt für die Kombinationsexperimente (2.4) zu haben und damit die Varianz zu minimieren. Somit handelt es sich für diese Substanzen nur bei dem in Tabelle 2-2 rot dargestellten Parameter um einen letalen Endpunkt, d.h. Embryonen mit diesem Effekt sind eindeutig „tot“.

Tabelle 2-2: Toxikologische Endpunkte des Embryotests- letale Effekte (†: Endpunkt wird zum angegebenen Zeitpunkt untersucht und entspricht einer letalen Wirkung; *: Endpunkt wird zum angegebenen Zeitpunkt untersucht).

Effekt	Zeit [h]					
	4	8	12	24	36	48
Koagulation	†	†	†	†	†	†
keine Somitenanlage				†/*	†/*	†/*
keine Schwanzablösung vom Dotter				†/*	†/*	†/*
kein Herzschlag					†/*	†/*

Koagulierte Embryonen wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt protokolliert. Sie sind selbst ohne Vergrößerung gut durch ihre milchig trübe Erscheinung zu erkennen und erscheinen im mikroskopischen Bild dunkel (Abbildung 2-5)

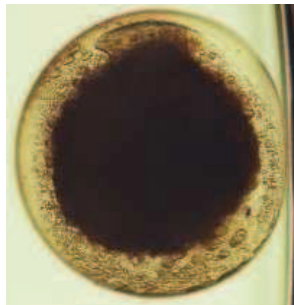


Abbildung 2-5: Koagulierter Embryo.

Das Fehlen der Somitenanlage, des Herzschlags sowie der Schwanzablösung vom Dotter wurden in den vorgestellten Untersuchungen, außer für die Klasse der Analgetika, ebenso, wie die in Tabelle 2-3 zusammengefassten Parameter, als subletale Endpunkte gewertet, die für die ökotoxikologische Bewertung von Chemikalien herangezogen werden können. Diese Endpunkte können Indikatoren für einen bestimmten Wirkmechanismus einer Substanz sein.

Tabelle 2-3: Toxikologische Endpunkte des Embryotests- subletale Effekte (* Endpunkt wird zum angegebenen Zeitpunkt untersucht).

Effekt	Zeit [h]					
	4	8	12	24	36	48
hohe Blastula	*					
keine Gastrulation		*	*			
keine oder deformierte Augenanlage				*	*	*
keine Spontanbewegung				*	*	*
deformierte Somitenanlage				*	*	*
deformierter Kopf				*	*	*
deformierter Schwanz				*	*	*
deformierte Wirbelsäule				*	*	*
kein Blutkreislauf					*	*
keine oder deformierte Otolithen					*	*
Herzschlagfrequenz						*

Nach 4 Stunden Expositionsdauer wurde überprüft, ob die Embryonen eine hohe Blastula ausgebildet hatten. Zu diesem Zeitpunkt war eindeutig erkennbar, ob die ausgewählten Eier wirklich befruchtet waren („Befruchtungskontrolle“). Zeigte ein Ei keine oder eine gelig durchscheinende (Abbildung 2-6a), statt einer fein-granulären hohen Blastula (Abbildung 2-4f, S. 13), wurde es als unbefruchtet eingestuft und nicht mit in die Auswertung einbezogen. Die Anzahl der Embryonen für die betreffende Konzentration wurde entsprechend korrigiert. Gleiches galt für Eier, die zu diesem Untersuchungszeitpunkt koaguliert waren. Betraf dieser Effekt weniger als 10 Prozent der Embryonen einer beliebigen Konzentration und entwickelten sich die übrigen Individuen normal, wurde dies auf einen Fehler in der Eidifferenzierung zurückgeführt und das Ei als unbefruchtet eingestuft. Auch in diesem Fall wurde die Zahl der eingesetzten Eier entsprechend korrigiert. Es wurden zudem Deformationen an der hohen Blastula protokolliert (Abbildung 2-6b-d).

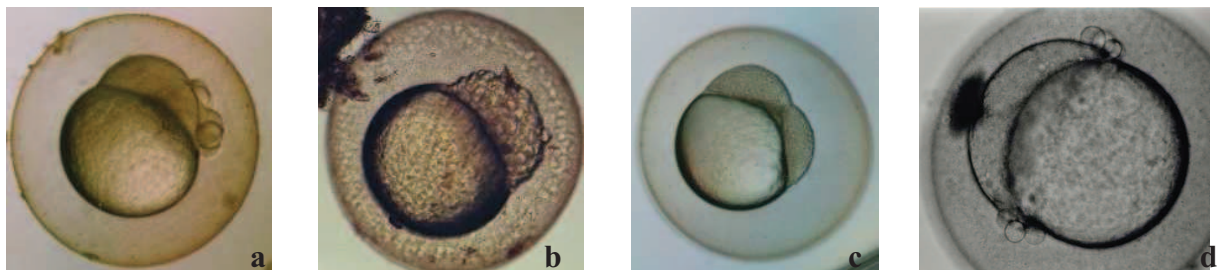


Abbildung 2-6: a) gelig durchscheinende Blastula-ähnliche Gestalt eines unbefruchteten Embryos; b) großzellige hohe Blastula; c) zwei-geteilte hohe Blastula; d) seitlich an der Blastula abgeschnürte Bläschen (Schulte, 1997).

Nach 8 Stunden wurde überprüft, ob bei den Embryonen die Epibolie eingesetzt hatte. Nach 12 Stunden wurde kontrolliert, ob der Blastoporus geschlossen und die Gastrulation

damit beendet war. Zeigten sich hier Verzögerungen oder Anomalien konnte dies ein Hinweis auf den Wirkmechanismus der Testsubstanz sein (Abbildung 2-7; vgl. Abbildung 2-4g, S. 13).

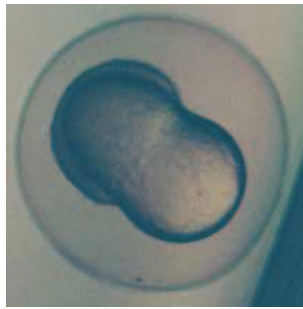


Abbildung 2-7: Embryo mit Hantelsyndrom etwa 8 Stunden nach der Befruchtung.

Nach 24 Stunden wurde untersucht, ob die Embryonen Augenanlage, Spontanbewegungen, Sacculi und Somiten aufwiesen, auch sollte der Schwanz vom Dotter abgelöst sein (Abbildung 2-4k, S. 13). Es wurde auch das Auftreten von Deformationen an Augenanlage, Somiten und Kopf protokolliert (Abbildung 2-8b, j-l; e). Des weiteren wurde das Auftreten von teratogenen Effekten an Schwanz und Wirbelsäule registriert. Derartige Malformationen umfassen Auffälligkeiten im Aufbau der Wirbelsäule wie z.B. Knicke und Veränderungen in der Anatomie des Schwanzes, wie z.B. Verkürzungen, Knicke oder Deformationen in der Schwanzspitze (Abbildung 2-8c-h), wobei unterschiedliche Ausprägungen bei der Exposition gegenüber der gleichen Substanz beobachtet werden konnten. Abbildung 2-8 gibt einen Überblick über die verschiedensten zu beobachtenden Effekte.

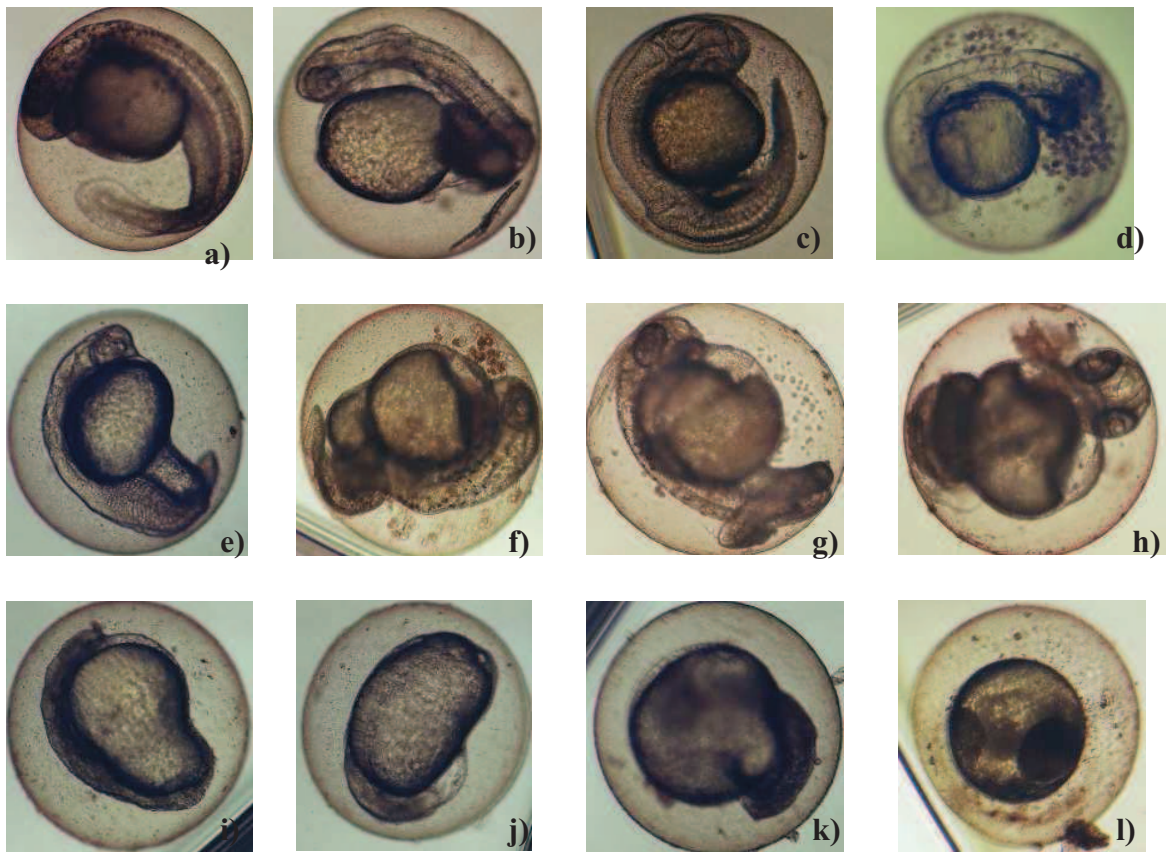


Abbildung 2-8: a) gelblich verfärbter Embryo; b) Embryo mit Kopfdeformation.; c, d) Embryonen mit deformierten Wirbelsäulen; e-h) Embryonen mit deformierten Schwänzen: e) verkürzter Schwanz und deformierte Somiten („Verbreiterung“); f) „Knick“; g) „Schlinge“; h) „Sprungfeder“; i) in Entwicklung verzögerter Embryo mit fehlender Augenanlage und Schwanzablösung vom Dotter; j) Embryo mit Somiten jedoch ohne Kopf und Schwanz; k) Embryo nur mit Schwanzanlage; l) Embryo nach 24h „Dotter und Gewebe“, keine embryonalen Strukturen erkennbar

Ein Effekt, der sowohl nach 24 und 36 als auch nach 48 Stunden auftreten kann, ist eine gelbliche bis gelbbraune Verfärbung der Embryonen (Abbildung 2-8a). Zeller (1995) hat diese Beobachtungen an Embryonen gemacht, die gegenüber Verapamil exponiert waren. Sie zitiert Stainier & Fishman (1992). Diese Autoren beschreiben im mikroskopischen Bild opake erscheinende Körperstrukturen für Embryonen von *Danio rerio* nach Retinsäurebehandlung. Sie identifizierten diese als Bereiche absterbender Zellen.

Zum Untersuchungszeitpunkt „36 Stunden“ wurde überprüft, ob sich Blutkreislauf, Herzschlag und Otolithenanlage entwickelt hatten. Effekte auf die Otolithenanlage zeigten sich in unterschiedlicher Ausprägung. Normalerweise werden zwei Otolithen pro Sacculus ausgebildet (Abbildung 2-9c). Unter Substanzexposition können diese jedoch auch fehlen (Abbildung 2-9d) oder aber in einer Überzahl angelegt werden (Abbildung 2-9a, b). Deformationen wurden ebenfalls protokolliert. Um den Parameter „vorhandener Blutkreislauf“ zu erfüllen, mussten Dotter-, Augen-, und Schwanzkreislauf vorhanden sein.



Abbildung 2-9: a; b) in Überzahl ausgebildete Otolithen (b: Brust, 2001); c) normal paarig ausgebildete Otolithen; d) fehlende Otolithen (Brust, 2001).

Nach 48 Stunden sollten die Embryonen zudem pigmentiert sein (Abbildung 2-10) und einen messbaren Herzschlag zeigen. Der Herzschlag wurde als einziger quantitativer Parameter über 15 Sekunden gezählt und dann auf eine Minute extrapoliert. Er diente der NOEC/LOEC-Berechnung (2.9). Auch wurde das Auftreten von Ödemen und Deformationen protokolliert. Als Ödem wurden dabei Ansammlungen von Flüssigkeiten und Blutkörperchen im Bereich des Dotters und des Perikards gewertet, die zu Verformungen in den genannten Bereichen führten (Abbildung 2-11a,b). Seltener traten Ödeme auch im Bereich des Schwanzes auf (Abbildung 2-11c). Ödeme werden v.a. bei fehlendem Blutkreislauf beobachtet.

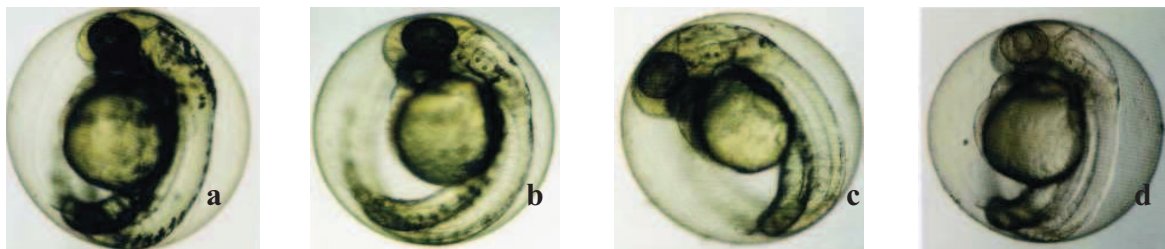


Abbildung 2-10: a) normal pigmentierter Embryo nach 48h; b,c) reduzierte Pigmentierung; d) fehlende Pigmentierung (a-d aus Maiwald, 1997).

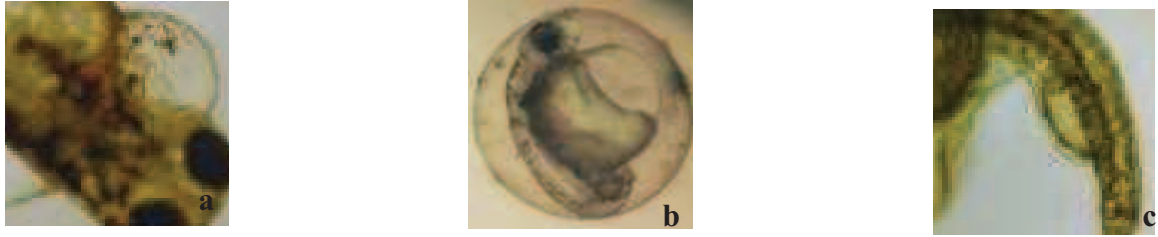


Abbildung 2-11: a) Embryo mit Perikardödem (Foto: M. Zimmer); b) Embryo mit Dotterödem; c) Schwanzödem.

Anschließend wurde der Versuch beendet und die überlebenden Embryonen durch Erhitzen oder MS222 (Tricain) abgetötet.

2.4 Kombinationswirkung

Die Risikobewertung von Chemikalien basiert zum einen auf einer Expositionsabschätzung, in die Daten über die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Substanz, ihr Produktionsvolumen, Daten zur Verteilung in der Umwelt etc. einfließen und in der über mathematische Modelle eine PEC (predicted environmental concentration) ermittelt wird. Zum anderen wird eine Wirkungsabschätzung durchgeführt, die zur Ermittlung einer PNEC (predicted no effect concentration) führt. Ist dann das Verhältnis aus $PEC/PNEC > 1$ so ergibt sich ein Risiko.

Die Ermittlung der PNEC erfolgt mittels Labordaten, die in standardisierten Testverfahren mit Algen, Daphnien, Fischen und anderen Organismen gewonnen werden. Es wird dabei grundsätzlich eine Bewertung von Einzelstoffen vorgenommen. Die Lebensgemeinschaften limnischer und auch mariner Ökosysteme sind jedoch meist einer Vielzahl von Stoffen ausgesetzt, die sich in ihrer Toxizität wechselseitig beeinflussen können (Altenburger et al., 2000; Grimme et al., 1998).

Aufgrund der Vielzahl, der in der Umwelt vorliegenden Stoffe sowie der räumlichen und zeitlichen Variabilität der Zusammensetzung der Mischungen in der Umwelt, ist eine Prüfung aller potentiellen Mischungen praktisch auszuschließen. Alternativ muss daher auf Basis der vorhandenen Daten der Einzelstoffe eine Abschätzung des Zusammenwirkens der einzelnen Mischungskomponenten vorgenommen werden. In der Literatur werden zwei konkurrierende Konzepte beschrieben, mit denen die Toxizität einer Mischung auf Basis der bekannten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelsubstanzen vorhergesagt und bewertet werden kann: *Konzentrationsadditivität* und *Unabhängige Wirkung* (Cleuvers, 2003, Walter et al., 2002). Sie basieren auf unterschiedlichen Annahmen in Bezug auf die Wirkmechanismen der einzelnen Mischungskomponenten (Junghans et al., 2003; Backhaus et al., 2003):

2.4.1 Konzentrationsadditivität (CA)

Diesem Konzept liegt die Annahme einer ähnlichen Wirkung der Mischungskomponenten zugrunde. Allgemein bedeutet dieses Konzept, dass sich eine Substanz in bezug auf den untersuchten Wirkparameter wie die Verdünnung einer anderen Substanz verhält, d.h. dass die untersuchten Substanzen parallele Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aufweisen und sich nur in ihrer relativen Wirkstärke unterscheiden (sham combination). Im engeren Sinn wird CA dann als gegeben angenommen, wenn die Mischungskomponenten einen identischen molekularen Wirkmechanismus und eine ähnliche Wirkungsweise aufweisen. Ersetzt man eine Mischungskomponente ganz oder teilweise durch eine entsprechende äqui-effektive Fraktion, d.h. eine gleich wirksame Konzentration einer anderen Substanz, sollte bei CA der Effekt des Stoffgemisches konstant bleiben (Grimme et al., 2000; Könemann, 1981; Silva et al., 2002; Walter, 2002).

Mathematisch lässt sich dieses Konzept für eine binäre Mischung wie folgt ausdrücken:

$$c_1/EC_{x1} + c_2/EC_{x2} = 1 \quad \text{Gleichung 1}$$

wobei c die Konzentrationen der Stoffe 1 und 2 in der Mischung sind und EC_x , die Konzentrationen, die erforderlich sind, um im Einzelsubstanzversuch einen bestimmten Effekt x hervorzurufen. Für eine multiple Mischung ergibt sich:

$$\sum_{i=1}^n c_i/EC_{xi} = 1 \quad \text{Gleichung 2}$$

(Berenbaum, 1985).

Dabei ist n die Anzahl der Mischungskomponenten, EC_{xi} ist die Konzentration der i -ten Mischungskomponente, die x % Effekt hervorruft, wenn sie allein appliziert wird und c_i ist die Konzentration der jeweiligen Substanz in der Mischung. Jeder einzelne Quotient aus c_i und EC_{xi} wird auch als Toxic Unit (TU) der entsprechenden Substanz i bezeichnet (Junghans et al., 2003). Für die Vorhersage der Mischungstoxizität lässt sich Gleichung 2 wie folgt umformen:

$$EC_{x(\text{Mix})} = 1 / (\sum p_i/EC_{xi}) \quad \text{Gleichung 3}$$

wobei $EC_{x(\text{Mix})}$ die Konzentration der Mischung ist, die einen bestimmten Effekt x hervorruft und p_i der relative Anteil der Konzentration einer bestimmten Mischungskomponente i (c_i) an der Gesamtkonzentration der Mischung (C_{mix}) (Gleichung 4).

$$p_i = c_i / C_{\text{mix}}$$

Gleichung 4

(Altenburger et al., 2000; Backhaus et al., 2000; Junghans et al., 2003).

Anhand von Gleichung 3 kann dann für jeden beliebigen Effekt der Mischung die entsprechende Gesamtkonzentration berechnet werden. Die Kalkulation der Gesamtkonzentration der Mischung für verschiedene Effekt-Level führt zu einer Vorhersage einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für das Konzept der *Konzentrationsadditivität*.

2.4.2 Unabhängige Wirkung (IA)

Das alternative Konzept der *Unabhängigen Wirkung* (IA) basiert, im Gegensatz zu dem Konzept der *Konzentrationsadditivität*, auf der Annahme einer unähnlichen Wirkung der einzelnen Mischungskomponenten. Unähnlich bedeutet dabei, dass die Mischungskomponenten unterschiedliche Wirkmechanismen haben, d.h., dass die primäre Interaktion an unterschiedlichen Wirkorten stattfindet (Grimme et al., 2000), z.B. an unterschiedlichen molekularen Zielen oder verschiedenen Organen bzw. Organsystemen im exponierten Organismus (Altenburger et al., 2000). Die Auslösung des gemeinsamen Effektes erfolgt also über unterschiedliche, voneinander unabhängige Wirkketten (Grimme et al., 2000; Köne-mann, 1981; Walter, 2002). Nach Grimme et al. (1998) wird postuliert, dass unter diesen Bedingungen der relative Effekte einer Substanz in Gegenwart einer zweiten unverändert bleibt.

Für eine binäre Mischung lässt sich dieses Konzept wie folgt mathematisch formulieren:

$$E(\text{Mix}) = E(c_1) + E(c_2) - E(c_1) * E(c_2) \quad \text{Gleichung 5}$$

wobei $E(\text{Mix})$ der Effekt ist, der durch die binäre Mischung aus Substanz 1 und Substanz 2 hervorgerufen wird. $E(c_1)$ and $E(c_2)$ sind die Effekte, die durch die Einzelsubstanzen 1 und 2 hervorgerufen werden (Walter, 2002a). Für eine multiple Mischung aus n Komponenten ergibt sich:

$$E(\text{Mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1-E_i) \quad \text{Gleichung 6}$$

(Faust et al., 2003).

Für Vorhersagen der Toxizität von Mischungen auf Basis der NOEC der Einzelstoffe wird Gleichung 6 nach Walter et al. (2002) wie folgt umformuliert:

$$E(\text{NOEC}_1 + \dots + \text{NOEC}_n)_{\text{MIX}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(\text{NOEC}_i)) \quad \text{Gleichung 7}$$

wobei $E(\text{NOEC}_1 + \dots + \text{NOEC}_n)_{\text{MIX}}$ der vorhergesagte Mischungseffekt nach dem Konzept der *Unabhängigen Wirkung* ist. Die Effekte, die die Einzelstoffe an ihrer NOEC hervorrufen, wenn sie allein appliziert werden ($E(\text{NOEC}_i)$), werden anhand der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Einzelstoffe berechnet.

Die beiden vorgestellten Konzepte können bei der Untersuchung von geringen Konzentrationen zu extrem unterschiedlichen Abschätzungen der Mischungstoxizität führen. Es ist zu beachten, dass das Konzept der *Konzentrationsadditivität* mit Konzentrationen (EC_x -Effektkonzentrationen, Gleichung 1-4) rechnet, wohingegen in das Konzept der *Unabhängigen Wirkung* Effekte (E , Gleichung 5-7) einfließen (Backhaus et al., 2000; Grimme et al., 2000; Scholze und Backhaus, 2002, Walter et al., 2002). Die Berechnung der Vorhersagen nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* setzt also das Vorliegen von Effektkonzentrationen und damit die Kenntnis der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aller Einzelstoffe voraus. Für die Vorhersage der Mischungstoxizität nach dem Konzept der *Unabhängigen Wirkung* ist es dagegen notwendig die relativen Effekte der Konzentrationen der Mischungskomponenten zu kennen, wenn diese einzeln appliziert würden. Für das Konzept der *Konzentrationsadditivität* bedeutet das, dass auch Substanzen, die unter ihrer NOEC appliziert werden, trotzdem zum Gesamteffekt der Mischung beitragen, da jede Konzentration einer Mischungskomponente berücksichtigt wird (Cleuvers, 2003; Faust et al., 2003; Silva et al., 2002). Beim Konzept der *Unabhängigen Wirkung* tragen dagegen nur solche Substanzen zum Gesamteffekt bei, die in einer Konzentration vorliegen, in der sie auch allein appliziert einen Effekt auslösen würden (Faust et al., 2003; Grimme et al., 2000). Substanzen, die unterhalb ihrer individuellen NOEC eingesetzt werden, tragen daher nicht zum Gesamteffekt der Mischung bei. Werden folglich alle Komponenten einer Mischung unterhalb ihrer NOEC eingesetzt, zeigt sich kein Gesamteffekt der Mischung, da nur Effekte berücksichtigt werden (Broderius et al., 2005; Cleuvers, 2003; Walter et al., 2002).

Die Anwendbarkeit beider Konzepte ist in einer Reihe von Studien gezeigt worden. Für das Konzept der *Konzentrationsadditivität* konnte dies sowohl für ähnlich wirkende Stoffe (Altenburger et al., 2000; Brian et al., 2005; Faust et al., 2000; Junghans et al., 2003; Hermens et al., 1984a; Könemann, 1981) als auch für Mischungen aus Substanzen mit als unähnlich angenommen Wirkmechanismen experimentell demonstriert werden (Hermens und Leeuwangh, 1982, Hermens et al., 1984b). Dieses Konzept wird daher in der Literatur auch

als „general solution“ für die Vorhersage von Mischungstoxizitäten diskutiert (Berenbaum, 1985; Grimme et al., 1998; Walter, 2002). Da *Konzentrationsadditivität* i.d.R. eine höhere Toxizität eines Gemisches voraussagt als *Unabhängige Wirkung*, wird es daher auch als „realistic worst case“-Szenario bezeichnet (Backhaus et al., 2000; Grimme et al., 2000).

Die Anwendbarkeit des Konzeptes der *Unabhängigen Wirkung* für die Vorhersagbarkeit von Mischungstoxizitäten ist für Mischungen unähnlich wirkender Stoffe in der Literatur beschrieben worden (Backhaus et al., 2000; Faust et al., 2000, 2003; Walter et al., 2002). Die generelle Anwendbarkeit dieses Konzeptes wird jedoch kontrovers diskutiert, da es von der Annahme strikt voneinander verschiedener und unabhängiger Wirkmechanismen ausgeht. Es ist jedoch fraglich, ob diese Annahme in komplexen biologischen Systemen mit vielfältigen Wechselwirkungen der physiologischen Prozesse überhaupt eine reale Annahme darstellt (Grimme et al., 2000; Walter, 2002).

Die Vorhersagbarkeit der Toxizität von Mischungen ist, wie oben ausgeführt, an die Frage geknüpft, ob die einzelnen Mischungskomponenten im zu untersuchenden Testorganismus, z.B. den Embryonen des Zebrafisches, ähnlich oder unähnlich wirken. Es besteht weitestgehend Konsens darüber, dass im Falle ähnlicher Wirkweisen das Konzept der *Konzentrationsadditivität* eine begründete Annahme für das Zusammenwirken von Stoffen darstellt. Es wird jedoch kontrovers darüber diskutiert, wie eng oder wie weit der Begriff der Wirkungs-Ähnlichkeit gefasst werden kann. Zudem sind für die meisten in der Umwelt vorliegenden Verbindungen, die Wirkmechanismen nur zum Teil oder gar nicht bekannt. Dabei führt der Umstand, dass zwei konkurrierende Konzepte zur Verfügung stehen und strittig ist, wann welches der beiden angewendet werden sollte, zu einem Assessment- oder Beurteilungsdilemma (Grimme et al., 1998). Altenburger et al. (2003) geben als Lösung dieses Problems die Möglichkeit an, beide Referenzmodelle parallel anzuwenden und den Bereich der erwarteten Effekte als „Vorhersagefenster“ für den Mischungseffekt zu nutzen.

2.4.3 Vorgehensweise bei der Analyse von Kombinationswirkungen

Die Vorgehensweise bei der Untersuchung der Kombinationswirkung lässt sich in fünf Schritte einteilen, wie Abbildung 2-12 zu entnehmen ist.

Nach der Auswahl der Mischungskomponenten werden diese mit einem entsprechenden Biotest, in den vorgestellten Untersuchungen mit dem Embryotest (*DarT*), untersucht. Die dabei ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe bilden dann die Ausgangsbasis für das weitere Vorgehen, wobei die Qualität der ermittelten Daten die Aussagemöglichkeit der Mischungsstudie bestimmt. In einem nächsten Schritt werden mit den untersuchten Einzelstoffen Gemische gebildet, die dann ebenfalls im Biotest untersucht werden. Es ist eine Reihe von Herangehensweisen bei der Analyse von Mischungstoxizitäten möglich. In den vorgestellten Untersuchungen wurden, mit Ausnahme der Vorversuche nach Cleuvers (2003) sowie der Mischungen auf Basis der NOEC (Punktschätzungen), alle Versuche zur Kombinationswirkung der Modellsubstanzen im „fixed ratio“-Design durchgeführt,

d.h., das Mischungsverhältnis der Konzentrationen der einzelnen Mischungskomponenten zueinander wurde konstant gehalten und nur die Gesamtkonzentration des Gemisches variiert. Mit diesem Design kann auch für die Mischung eine vollständige Konzentrations-Wirkungsbeziehung aufgenommen werden.

Es wurden drei unterschiedliche Mischungsverhältnisse untersucht. In den Vorversuchen mit den Analgetika nach dem *modified toxic unit approach* (2.4.4) wurden die Substanzen auf Basis der $LC_{50}(48h)$ miteinander kombiniert. In den Hauptversuchen wurden in einem Ansatz die einzelnen Substanzen auf Basis der $LC_{20}(48h)$ miteinander gemischt; in einem zweiten Ansatz auf Basis der $LC_{10}(48h)$. Die Versuche zur Eignung subletaler Endpunkte für die Vorhersage der Toxizität von Mischungen wurden mit binären Gemischen jeweils auf Basis der $EC_{50}(48h)$ für einen bestimmten subletalen Effekt durchgeführt.

Parallel dazu erfolgt die Prognose der zu erwartenden Mischungstoxizität des Gemisches auf Basis der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe mittels der beiden beschriebenen Konzepte. Im letzten Schritt werden dann vorhergesagte und beobachtete Mischungstoxizität miteinander verglichen.

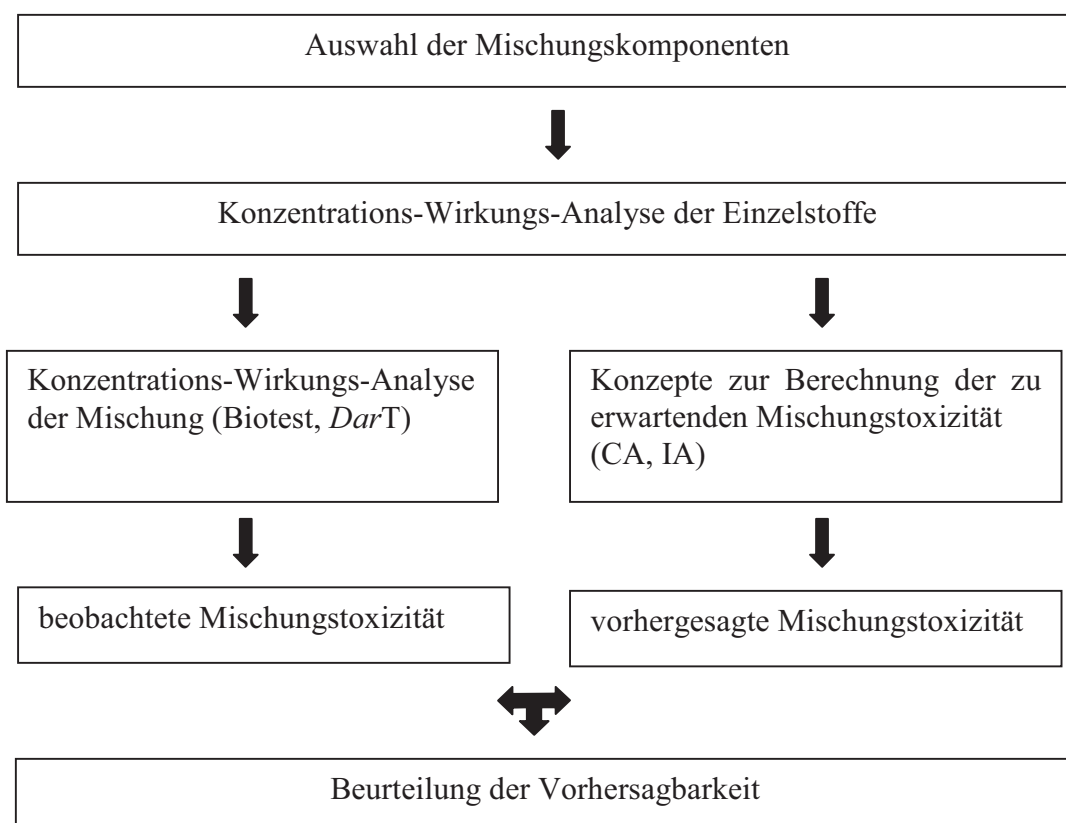


Abbildung 2-12: Vorgehen bei der Analyse der Kombinationswirkung von Chemikalien (verändert nach Grimme et al., 2000).

Da die beiden Konzepte für die Vorhersage von Mischungstoxizitäten nur die "Fälle" berücksichtigen, in denen alle Mischungskomponenten den selben experimentellen Endpunkt

angreifen (Backhaus et al., 2003), wurde zum einen Mortalität als gemeinsamer Endpunkt gewählt (zur Problematik, 2.3). Für die Analgetika wurden hierbei zwei unterschiedliche Ansätze untersucht. In einem Ansatz wurden alle vier, nach Schulte & Nagel (1994) als letal definierten Endpunkte als letal gewertet und die LC_x -Werte entsprechend berechnet. In einem zweiten Ansatz wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Zum anderen wurde für die drei subletalen Endpunkt „fehlender Blutkreislauf“, „Deformationen“ und „Pigmentierung“ (2.3) exemplarisch überprüft, ob sich auch anhand dieser Daten die Toxizität von Mischungen vorhersagen lässt.

2.4.4 Vorversuche zur Mischung der Analgetika

In der Literatur werden eine Reihe von Modellen und Methoden beschrieben, die die beiden Vorhersagekonzepte in mathematische oder statistische Verfahren der praktischen Datenauswertung umsetzen. Um einen geeigneten Ansatz für die Hauptversuche zu finden, wurden zwei unterschiedliche Modelle in Vorversuchen getestet.

Ansatz nach Cleuvers (2003)

Da Gleichung 2 genau dann erfüllt ist, wenn jeweils $1/n$ der einzelnen Mischungskomponenten eingesetzt wird, wurde für die Vorversuche mit den fünf Analgetika Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol jeweils $1/5$ der einzelnen $LC_x(48h)$ -Konzentrationen (Test 1 & 2: LC_5 , LC_{10} , LC_{20} , LC_{50} , LC_{70} ; Test 3: LC_{10} , LC_{20} , LC_{50} , LC_{70} , LC_{99}) eingesetzt. Bei additiver Mischungstoxizität sollten in den einzelnen Ansätzen 5, 10, 20, 30, 50, 70 bzw. 99% der eingesetzten Embryonen letale Effekte zeigen.

Ansatz mit dem *modified toxic unit approach* nach Pape-Lindstrom & Lydy (1997)

In diesem Modell wird ausgehend von einem bestimmten Effekt-Niveau, in den vorgestellten Untersuchungen der $LC_{50}(48h)$, eine Verdünnungsreihe untersucht (ray-design). Es entsteht eine sogenannte äquitoxische Mischung, in der alle Mischungskomponenten im gleichen Verhältnis zueinander vorliegen (fixed ratio design, Gleichung 8).

$$\Sigma TU = C_1/LC_{501} + C_2/LC_{502} + \dots + C_i/LC_{50i}, \quad \text{Gleichung 8}$$

wobei C_i die Konzentration einer bestimmten Substanz i in der Mischung ist, LC_{50i} , die Konzentration der Substanz i , bei der 50% der eingesetzten Versuchsorganismen im Einzelsubstanzversuch sterben.

Ausgehend von dieser Gleichung wurden fünf Konzentrationen untersucht, wobei jeweils zwei eine Gesamtkonzentration unter bzw. über 1 TU aufwiesen. Eine Konzentration hatte eine Gesamtkonzentration von genau 1TU.

Anhand der, durch Auftragen der beobachteten Effekte gegen die Toxic Units ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Mischung konnte eine $LC_{50}(48h)$ berechnet werden. Nach Pape-Lindstrom & Lydy (1997) und Overmyer et al. (2003) kann dann anhand dieser LC_{50} die Mischungstoxizität wie folgt beurteilt werden:

$LC_{50} < 1 TU$	mehr als additiv
$LC_{50} = 1 TU$	additiv (CA)
$LC_{50} > 1 TU$	weniger als additiv (IA).

2.5 Versuchsdurchführung

2.5.1 Testmedium ISO-Wasser

Um vergleichbare Testbedingungen zu schaffen, diente als einheitliches Test- und Verdünnungsmedium rekonstruiertes Wasser nach dem ISO-Standard 7346/3, wie es in den OECD-Guidelines 202 (OECD, 1984) und 203 (OECD, 1992) beschrieben wird. Die Bestandteile sind Tabelle 2-4 zu entnehmen. Die Herstellung des Mediums erfolgte in Anlehnung an den Standard, allerdings wurden die Konzentrationen auf 1/5 reduziert, um den Härtebereich von ca. 3°dH einzustellen.

Tabelle 2-4: Bestandteile ISO-Wasser.

Substanz	eingesetzte Menge [g]	Firma	Reinheit
$CaCl_2 * 2 H_2O$	11,76	Fluka	>> 99,5%
$MgSO_4 * 7 H_2O$	4,93	Merck	zur Analyse
$NaHCO_3$	2,59	Merck	zur Analyse
KCl	0,23	Merck	zur Analyse

Für die vier einzelnen Stammlösungen wurden die angegebenen Mengen eingewogen und in doppelt deionisiertem Wasser (Milli Pore Stufe 2; MP II) gelöst. Anschließend wurden die Glaskolben mit diesem MP II-Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Die so erhaltenen Stammlösungen wurden bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Vor dem Ansetzen wurden die einzelnen Lösungen jeweils auf Zimmertemperatur erwärmt. Von diesen Stammlösungen wurden für einen Liter Verdünnungsmedium je 5 mL entnommen, gemischt und mit MP II-Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Belüftung bis zur Sauerstoffsättigung.

2.5.2 Lösungsvermittler

Da Lösungsvermittler die Permeabilität von Membranen und somit die Verfügbarkeit der Substanz am Wirkort beeinflussen können, wurde auf ihren Einsatz verzichtet. Alle Testsubstanzen wurden nur bis zu ihrer Löslichkeitsgrenze untersucht.

2.5.3 Probenvorbereitung

Die Prüfung der akuten Toxizität der unter Punkt 2.8 beschriebenen Modellsubstanzen erfolgte sowohl bei den Einzelsubstanzversuchen als auch bei den Gemischen in mindestens fünf Konzentrationen, die sich in einem konstanten Faktor unterschieden.

2.5.3.1 Einzelsubstanztests

Am Vortag des Versuches wurden die entsprechenden Stammlösungen angesetzt. Dafür wurde die abgewogene Substanzmenge unter dem Abzug in einen Messkolben (100 oder 250 mL-Kolben) überführt. Wägschälchen und Trichter wurden mehrmals mit ISO-Wasser gespült und dann der Messkolben mit ISO-Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Schwerlösliche Substanzen wurden mit Hilfe des Magnetrührers (bis zu 48h) und durch Ultraschallbehandlungen gelöst. Bis zu Versuchsbeginn wurden die Stammlösungen dunkel (in Alufolie) und kühl (4°C, im Kühlschrank) aufbewahrt.

Am Versuchstag wurden zunächst in die vorbereiteten 24-Wellplatten, in je vier Wells, jeweils 2 mL ISO-Wasser als interne Kontrolle pipettiert (Abbildung 2-13).

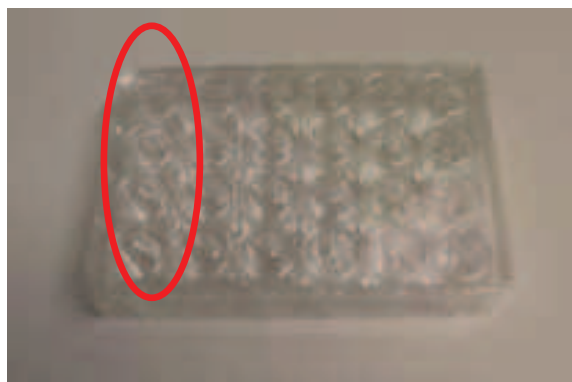


Abbildung 2-13: 24-Wellplatte mit 4 internen Kontrollen (Kreis).

Anschließend wurden die einzelnen Verdünnungen der Testlösungen hergestellt, indem eine entsprechende Menge aus der Stammlösung in einen 100 mL-Kolben pipettiert und dieser mit ISO-Wasser aufgefüllt wurde. Durch mehrmaliges Schwenken des Kolbens wurde eine gute Durchmischung sichergestellt. Die Testlösungen wurden dann in ein 120 mL-

Becherglas überführt, wobei anschließend je 2 mL der entsprechenden Verdünnungsstufe in die entsprechenden Wells einer Wellplatte pipettiert wurden. Sechzig mL verblieben für die Vorexposition der Embryonen im Becherglas, das anschließend mit Parafilm abgedeckt wurde.

Im Anschluss wurden die Bechergläser und die Wellplatten in einen Kühlbrutschrank bei einer Temperatur von 26°C eingestellt, um eine entsprechende Temperatur der Flüssigkeiten zu gewährleisten. Das weitere Vorgehen ist unter Punkt 2.5.4 dargestellt.

2.5.3.2 Kombinationsexperimente

Für jede Mischungskomponente wurde eine separate Stammlösung angesetzt, deren Konzentration der LC₂₀(48h) bzw. der LC₁₀(48h) der jeweiligen Substanz entsprach. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden dann die einzelnen Verdünnungsstufen hergestellt, indem eine entsprechende Menge der einzelnen Substanzen in einen 100mL-Kolben gegeben, miteinander gemischt und mit ISO-Wasser auf 100 ml aufgefüllt wurde.

Für Mischungen auf Basis der NOEC wurden die entsprechenden Mengen der einzelnen Mischungskomponenten direkt in einen gemeinsamen Kolben eingewogen und gelöst.

2.5.4 Versuchsansatz

Um eine möglichst frühe Exposition in den Testlösungen zu gewährleisten, wurden kurz nach der Entnahme der Laichschalen aus den Becken (2.1.4) zunächst 40 Eier ohne Differenzierung in befruchtete und unbefruchtete Eier mittels einer Einwegpasteurpipette aus der Flachbodenschale auf die vorbereiteten Bechergläser mit den entsprechenden Substanzen (mind. fünf Konzentration plus Kontrolle) verteilt (2.5.3.1.). Dabei wurde darauf geachtet, möglichst wenig Wasser aus der Flachbodenschale mit in die Expositionsgefäße zu pipettieren, um die Verdünnung der Testlösungen zu minimieren. Die Gläser wurden auf Heizplatten gestellt, um die Temperatur von 26°C zu halten und somit eine zeitgerechte Embryonalentwicklung zu gewährleisten. Diese Vorgehensweise sicherte eine Exposition der Eier zu einem möglichst frühen Entwicklungszeitpunkt. Sander und Baumann (1983) zeigten, dass eine Exposition der Eier innerhalb der ersten zwei Stunden notwendig ist, da einzig eine frühe Entwicklungsanomalie eine ganze Kette von Folgeschäden nach sich ziehen kann.

Anschließend erfolgte die Differenzierung in befruchtete und unbefruchtete Eier mittels eines Binokulars. Dafür wurden die Eier aus den Bechergläsern mittels Pipette in ein Blockschälchen gegeben. Aus diesem wurden dann die befruchteten Eier einzeln, mittels einer 20 µL-Pipette mit abgeschnittener und entgrateter Spitze, in die Wells der entsprechenden Multiwellplatte überführt. Die Exposition erfolgte statisch.

Bei der Auswahl der befruchteten Eier wurde auf folgende Merkmale geachtet:

- mindestens Vier-Zellstadium
- symmetrische Furchungsformen
- symmetrisch ausgebildete Blastomere
- durchscheinende Blastomere.

Die Embryonen befanden sich zum Zeitpunkt des Einsetzens meist im Vier- bis 32-Zellstadium. Nach dem Einsetzen der Embryonen wurden die Platten mit einer selbstklebenden Polystyrenfolie verschlossen, um das Verdunsten des Mediums und damit eine Konzentrationsveränderung zu verhindern. Des Weiteren kann sich dadurch bei Substanzen mit höherem Dampfdruck ein Gleichgewicht zwischen Wasser- und Gasphase einstellen, da diese nicht ungehindert entweichen können.

Anschließend wurden die Platten im Kühlbrutschrank bei 26°C inkubiert. Das Lichtregime war auf 12 Stunden Hell und 12 Stunden Dunkel eingestellt.

Innerhalb der nächsten 48 Stunden wurden dann die unter Punkt 2.3 genannten letalen und subletalen Endpunkte zu den entsprechenden Zeiten mit Hilfe eines Umkehrmikroskops untersucht.

2.5.4.1 Zytostatika

Aufgrund der Gefährlichkeit der beiden untersuchten Stoffe Cyclophosphamid und Ifosfamid (2.8) waren besondere Sicherheitsvorkehrungen notwendig. Die vorbereiteten Wellplatten (2.5.3.1) wurden daher unter dem Abzug belassen. Es erfolgte keine Vorexposition der Embryonen in Substanz sondern in ISO-Wasser. Die Auswahl der befruchteten Eier erfolgte analog zu der „normaler“ Einzelsubstanzversuche. Die 20 befruchteten Embryonen je Konzentration wurden dann aus dem ISO-Wasser unter dem Abzug in die Wellplatten mit der Substanz überführt. Anschließend wurden die Wellplatten ebenfalls mit Folie verschlossen. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zu den übrigen untersuchten Substanzen.

2.5.4.2 Substanzen mit $\log K_{ow}$ -Werten⁶ über 3

Bei Substanzen mit einem $\log K_{ow}$ größer 3 wird von einem Bioakkumulationspotential ausgegangen. Aufgrund der damit verbundenen größeren Lipophilie ist nicht auszuschließen, dass diese Stoffe stärker an Kunststoff als an Glas adsorbieren. Da die für die vorgestellten Untersuchungen genutzten 24-Multiwellplatten aus Kunststoff bestanden, wurde für vier Substanzen mit $\log K_{ow}$ -Werte über 3 (2.8) zusätzlich die Exposition in Glas untersucht: Beza-

⁶ $\log K_{ow}$: Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient; Maß für die Lipophilie einer Substanz

fibrat ($\log K_{ow}$: 4,2), Erythromycin ($\log K_{ow}$: 3,06), 17- α -Ethinylöstradiol ($\log K_{ow}$: 4,2) sowie Fenofibrat ($\log K_{ow}$: 4,3). Die Exposition erfolgte in Rollrandgläsern. Hierbei wurden ebenfalls 2 mL der Lösung verwendet. Die Wandung der Gläser wurde vor dem Versuch für 24h mit der entsprechenden Konzentration „abgesättigt“. Es wurden anschließend 10 Embryonen pro Konzentration exponiert. Die Gläser wurden mit einem entsprechenden Deckel und Parafilm abgedeckt. Nach 4, 24 und 48 Stunden wurden die Embryonen auf das Auftreten von letalen und subletalen Effekten untersucht (2.3).

2.6 Analytik

Die untersuchten Konzentrationen wurden nicht analytisch geprüft, so dass sich alle Angaben auf Nominalkonzentrationen beziehen.

2.7 Mess-Parameter

Vor Versuchsbeginn wurden in den Bechergläsern der einzelnen Verdünnungsstufen (2.5.3.1) Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit, pH-Wert und Temperatur bestimmt. Nach Beendigung der Versuche wurden die Flüssigkeiten aus den Platten in Bechergläser pipettiert und dann die genannten Parameter in diesen gepoolten Proben bestimmt. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge im Anhang C (Tabelle 1-64) zusammengefasst.

2.7.1 pH-Wert

Über den pH-Wert können, nach Schulte (1997), zum einen die Bioverfügbarkeit und die Toxizität der Testsubstanzen für den untersuchten Organismus beeinflusst werden. Zum anderen kann der Organismus selbst auf den pH-Wert reagieren, z.B. durch veränderte Membraneigenschaften oder Enzymaktivitäten. Er konnte zeigen, dass pH-Werte zwischen 4,5 und 9,0 die Entwicklung der Embryonen nicht beeinflussen. Bei pH 4,5 zeigten jedoch 40% der untersuchten Embryonen Ödeme. Nach Brust (2001) werden pH-Werte im basischen zwischen 8,0 und 10,5 toleriert. Bei pH 11,0 traten in ihren Untersuchungen bei 15% der untersuchten Embryonen letale Effekte (Koagulation) auf. Ab pH 11,5 koagulierten alle eingesetzten Embryonen.

Zeigten sich bei den vorgestellten Untersuchungen vor Versuchsbeginn bei der Messung in allen Verdünnungsstufen pH-Werte außerhalb eines Bereichs von pH 5 bis 10, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem der pH-Wert der Stammlösung mittels 0,1N NaOH bzw. HCl eingestellt wurde.

2.7.1.1 0,1N NaOH

Für einen Liter 0,1N NaOH-Lösung wurden 4g NaOH-Plättchen benötigt. Aufgrund der starken exothermen Reaktion der Substanz mit Wasser wurde zunächst nur wenig MP II in einem 1L-Messkolben vorgelegt. Unter Kühlung und Rühren wurde die Substanz gelöst und der Kolben nach Abkühlung bis zur Eichmarke mit MP II aufgefüllt

2.7.1.2 0,1N HCl

Ausgehend von einer 2 molaren HCl wurde eine entsprechende 0,1N Lösung hergestellt.

2.7.2 Sauerstoff

Schulte (1997) hat in Vorversuchen festgestellt, dass innerhalb der 48-stündigen Versuchsdauer der Sauerstoff nicht als limitierender Faktor wirkt. Er stellte fest, dass der Luftvorrat in den Multiwellplatten ausreichend groß ist, um den Sauerstoffverbrauch während der gesamten Embryonalentwicklung zu decken. Zudem war die selbstklebende Folie, mit welcher die Platten verschlossen wurden, luftdurchlässig. Schulte (1997) gibt als einen möglichen Parameter für Sauerstoffzehrung starkes Wachstum von Mikroorganismen an. Es wurde in den vorgestellten Versuchen versucht diesen Einflussfaktor so gering wie möglich zu halten, indem die Eier mehrfach gespült und anhaftende Futterreste sowie Fäces der Elterntiere entfernt wurden (2.1.4).

Die Sauerstoffsättigung sollte, in Anlehnung an die Validitätskriterien nach den OECD-Guidelines No. 210 bzw. 212, sowohl zu Testbeginn als auch nach Testende zwischen 60 und 100% liegen.

2.7.3 Leitfähigkeit

Salze und andere Substanzen können in hohen Konzentrationen die Embryonen durch osmotische Effekte schädigen (Bachmann, 2002). Der Gesamtsalzgehalt oder die Osmolarität des Mediums kann zudem die Toxizität von Chemikalien beeinflussen (Schulte, 1997). Die beobachteten Effekte wären in diesen Fällen dann nicht auf einen substanzspezifischen Wirkmechanismus zurückzuführen. Lange (1993) hat die Wirkung von Harnstoff und Natriumchlorid auf die Embryonalentwicklung des Zebrafisches untersucht. Beide Substanzen verursachten vergleichbare Effekte in Form von Abschnürungen und Bläschenbildung im Bereich des Dotters in den ersten Stunden der Exposition, was zum Absterben der Keime führte. Die Autorin führt dies bei beiden Substanzen auf osmotische Effekte zurück. Sie gibt

an, dass bei einer Versuchsdauer von 48 Stunden bis zu einem Wert von 100mOsm/L osmotische Effekte auf die Embryonen ausgeschlossen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende die Leitfähigkeit bestimmt. Darüber ergibt sich über die Beziehung: $50\mu\text{S}/\text{cm}$ entsprechen etwa 1 mOsm/L (Furmanek, 2007) die Möglichkeit, die Osmolarität durch Umrechnen näherungsweise zu bestimmen. Als zulässiger Höchstwert wurden entsprechend der Arbeit von Lange (1993) 100 mOmol/L bzw. $5000\mu\text{S}/\text{cm}$ festgelegt.

2.8 Testsubstanzen

Im folgenden Kapitel werden die ausgewählten Testsubstanzen kurz charakterisiert und ihre wichtigsten chemisch-physikalischen Eigenschaften zusammengefasst. Daten zu Bezugsquelle und Reinheit finden sich im Anhang A.

2.8.1 N-Acetylcystein

Die folgenden Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt für N-Acetylcystein der Firma Merck (2003a), dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) und der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Einordnung:	Aminosäure-Derivat, Antitussivum, Antidot
Synonyme:	2-Acetamido-3-mercaptopropionsäure
Handelsname:	ACC, Airbron, Solmucol
CAS-nr.:	616-91-1
Summenformel:	C ₅ H ₉ NO ₃ S
Aggregatzustand:	weißer bis gelblicher Feststoff, Fremdgeruch
Molekulargewicht:	163,19 g/mol
Wasserlöslichkeit:	200 g/L (20°C)
Dampfdruck:	2,0*E-4 Pa
Henry-Konstante:	9,1*E-8 Pa*m ³ /mol
logK_{ow} :	-0,66 (berechnet, Merck)
BCF:	1,5*E-2
Toxizität:	LD ₅₀ (oral): 5050 mg/kg; Ratte LD ₅₀ (oral): 8000 mg/kg; Maus

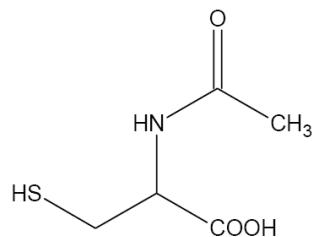


Abbildung 2-14: Strukturformel von Acetylcystein (ACC; arge Elbe, 2002).

2.8.2 Acetylsalicylsäure

Die folgenden Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt für Acetylsalicylsäure der Firma Merck (2002a), dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) und der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Salicylsäurederivate
Zuordnung:	saure antipyretisch-antiphlogistische, nicht-steroidale Analgetika (Forth et al., 2001; Bayer, 1999)
Synonyme:	2-Acetoxybenzoesäure,
Handelsname:	ASS, Aspirin® (Bayer, 1999), Alka-Seltzer, Togonal
CAS-nr.:	50-78-2
Summenformel:	C ₉ H ₈ O ₄
Aggregatzustand:	festes, farbloses, fast geruchloses Pulver
Molekulargewicht:	180.15 g/mol
Wasserlöslichkeit:	3,3 g/L (20°C)
Dichte:	1.35 g/cm ³
Dampfdruck:	0.000003 mmHg (20°C, Acros Organics, 2006)
pKa:	3,49
logK_{ow} :	1,19 (experimentell, Merck)
BCF:	<30
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 1124 mg/kg. LC ₀ (48h) > 1000 mg/L; <i>Leuciscus idus</i> EC ₅₀ (24h): 168mg/L; <i>Daphnia magna</i> LC ₅₀ (48h): 53,32 mg/L; <i>Danio rerio</i> (Bachmann, 2002)

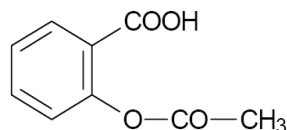


Abbildung 2-15: Strukturformel von Acetylsalicylsäure (ASS; BLAC, 1999).

2.8.3 Atropin

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) und Heath (2006) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Aufgrund der besseren Wasserlöslichkeit wurde Atropinsulfat monohydrat untersucht.

Einordnung:	Alkaloide
Synonyme:	Atropine, DL-hyoscamine, 1- α -H,5- α -H- tropan-3- α -OL-(\pm)-tropate (ester)
Handelsname:	Bellafit®N (Streuli, 2004)
CAS-nr.:	5908-99-6
Summenformel:	(C ₁₇ H ₂₃ NO ₃) ₂ , H ₂ SO ₄ *H ₂ O
Aggregatzustand:	geruchloser, farbloser bis weißer, sehr bitterer Feststoff
Molekulargewicht:	694,82 g/mol
Wasserlöslichkeit:	leicht löslich (1g/0,4 ml H ₂ O)
logK_{ow} :	63 (Atropin, Forth et al., 2001)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral): 75 mg/kg; Maus

Anwendungsgebiete:

Atropin findet hauptsächlich Anwendung als Antidot bei Vergiftungen mit Organophosphor- und anderen Verbindungen, die auf die Acetylcholinesterase wirken. Daneben findet es als Parasympatholytikum vielfältige Anwendung in der Veterinärmedizin (EMEA, 1998).

Vorkommen: Atropin kommt natürlicherweise vor in: *Atropa belladonna* (Tollkirsche), *Datura stramonium* (Stechapfel) und anderen *Solanaceen* (Nachtschattengewächsen). Bei der natürlich vorkommenden Substanz handelt es sich um ein Racematgemisch aus α -Hyoscamin und l-Hyoscamin, wobei nur die l-Form dabei die anti-muskarinische Aktivität besitzt (Forth et al., 2001).

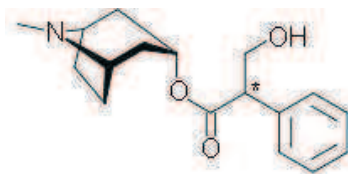


Abbildung 2-16: Strukturformel von Atropin (wikipedia, 2008).

2.8.4 Bezafibrat

Die folgenden Angaben sind dem Landesumweltamt Brandenburg (2002), dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Sigma- Aldrich (2007a) sowie Stien (2000) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Fibrate (Forth et al., 2001)
Zuordnung:	Lipidsenker
Synonyme:	2-(p-(2-(p-Chlorobenzamido)ethyl)phenoxy)2-methylpropionsäure
Handelsname:	Cedur® retard (Roche, 2003)
CAS-nr.:	41859-67-0
Summenformel:	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄
Aggregatzustand:	Feststoff
Molekulargewicht:	361,8 g/mol
Wasserlöslichkeit:	unlöslich
Henry-Konstante:	3,8*E-11 Pa*m ³ /mol
Dampfdruck:	1,4*E-11 Pa
logK_{ow} :	4,2
BCF:	783,4
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 1082 mg/kg. LD ₅₀ (oral, Maus): 723 mg/kg

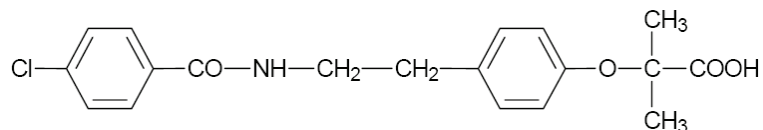


Abbildung 2-17: Strukturformel von Bezafibrat (BLAC, 1999).

2.8.5 Bisoprolol

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) und dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Merck entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Da in der Humanmedizin häufig Bisoprololfumarat angewendet wird (Bisoprolol Sandoz®, Sandoz, 2002; Lodoz®2,5/5/10; Merck, 2003; Concor®2,5/5/10, Merck2002a) wurde Bisoprolol hemifumarat untersucht.

Einordnung:	β-Blocker (Merck, 2002a, 2003b; Sandoz, 2002)
Synonyme:	1-[4-[[2-(1-methylethoxy)-ethoxy)methyl]phenoxy]-3- {(1-methylethyl)amino]-2-propanol (Daughton und Ter- nes, 1999)
Handelsname:	Bisoprolol Sandoz® (Sandoz, 2002), Concor® (Merck, 2002a), Lodoz® (Merck, 2003b)
CAS-nr.:	104344-23-2
Summenformel:	C ₃₆ H ₆₂ N ₂ O ₈ *C ₄ H ₄ O ₄
Aggregatzustand:	weißer, geruchloser Feststoff
Molekulargewicht:	766,96 g/mol
Wasserlöslichkeit:	>1000 g/L
logK_{ow}:	1,69 (Miege et al., 2006)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 1116 mg/kg

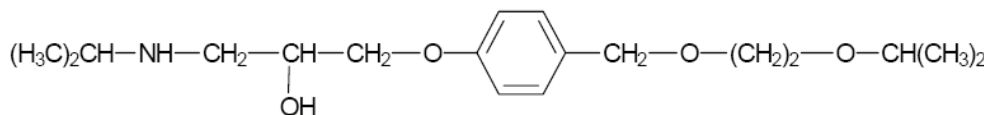


Abbildung 2-18: Strukturformel von Bisoprolol (BLAC, 1999).

2.8.6 Carbamazepin

Die folgenden Angaben sind der dem Landesumweltamt Brandenburg (2002), Feldmann (2005), Liebig (2005) und Mersmann (2003) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Harnstoffderivate, trizyklische Dibenzazepin-Derivate
Einordnung:	Antiepileptika (Antikonvulsiva), Psychopharmaka
Synonyme:	5H-Dibenz[b,f]azepin-5-carboxamid
Handelsname:	Tegretol® (Novartis Pharma, 2002), Neurotop® retard (Gerot, 2002)
CAS-nr.:	289-46-4
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O
Aggregatzustand:	weiße, kristalline Substanz
Molekulargewicht:	236,27 g/mol
Wasserlöslichkeit:	nahezu unlöslich (17,7 mg/L); 130 mg/L (Dihydrocarbamazepin)
Dampfdruck:	184*10 ⁻⁷ mmHg
Henry-Konstante:	1,5*E-6 P*m ³ /mol
logK_{ow} :	2,45
pK_a:	14,0
BCF:	6,5
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 1957 mg/kg (Acros Organics, 2005) LD ₅₀ (oral, Maus): 529 mg/kg (Acros Organics, 2005) EC ₅₀ (96h): 85 mg/L, <i>D. subspicatus</i> (Wachstum) EC ₅₀ (48h): 157 mg/L, <i>D. magna</i> , Akuttest LC ₅₀ (48h): 124 mg/L, <i>D. rerio</i> (DRETA) LC ₅₀ (48h): > 100 mg/L, <i>D. rerio</i> (DarT)

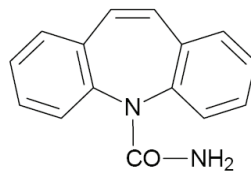


Abbildung 2-19: Strukturformel von Carbamazepin.

2.8.7 Carbaryl

Die folgenden Angaben sind Streit (1992) und der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Einordnung:	Insektizide
Wirkstoffklasse:	Carbamate, Carbaminsäurederivate
Synonyme:	1-Naphthyl-N-methyl-carbamat, Dicarbam, Sevin, Mervin, Denapon
CAS-nr.:	63-25-2
Summenformel:	$C_{12}H_{11}O_2N$
Aggregatzustand:	weißes, kristallines Pulver
Molekulargewicht:	201.2 g/mol
Wasserlöslichkeit:	50 mg/L (20°C)
Dichte:	1,232
Dampfdruck:	0,6 mPa (25°C)
logK_{ow} :	2,36
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 540 mg/kg LC ₅₀ (n.n.): 28 mg/L <i>Carassius auratus</i> LC ₅₀ (48h): 4,7 mg/L <i>Danio rerio</i> (DarT, Schulte, 1997)

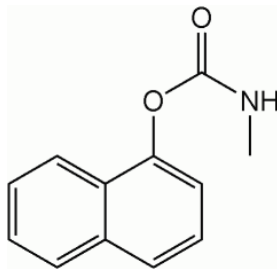


Abbildung 2-20: Strukturformal von Carbaryl (wikipedia, 2008).

2.8.8 Chloramphenicol

Die folgenden Angaben sind den Sicherheitsdatenblättern für Chloramphenicol der Firmen Merck Biosciences (2003), Carl Roth (2003), Alfa Aesar (2006) und Acros Organics (2001) und Sigma-Aldrich (2006a) sowie wikipedia (2006b) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Makrolid-Antibiotika
Zuordnung:	Antibiotika (Halling- Sorensen et al., 1998)
Synonyme:	D-threo-2-Dichloracetamido-1-(4-nitrophenyl)-propan-1-3-diol
Handelsname:	Chloromycetin, Levomycetin (Knox, 2008)
CAS-nr.:	56-75-7
Summenformel:	$C_{11}H_{12}N_2O_5$
Aggregatzustand:	weißer, kristalliner Feststoff; extrem bitterer Geschmack (Forth et al., 2001)
Molekulargewicht:	323,1 g/mol
Wasserlöslichkeit:	2,5 mg/ml (25°C)
Dichte:	0,7 g/cm ³ (20°C)
logK_{ow} :	1,14
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 2500 mg/kg LD ₅₀ (oral, Maus): 1500 mg/kg EC ₅₀ (24h): 1095 mg/L, <i>Daphnia magna</i> , (arge-elbe, 2003)

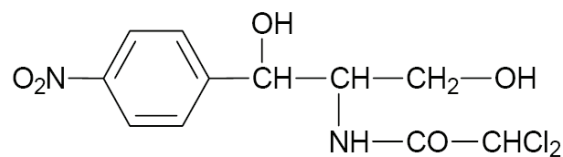
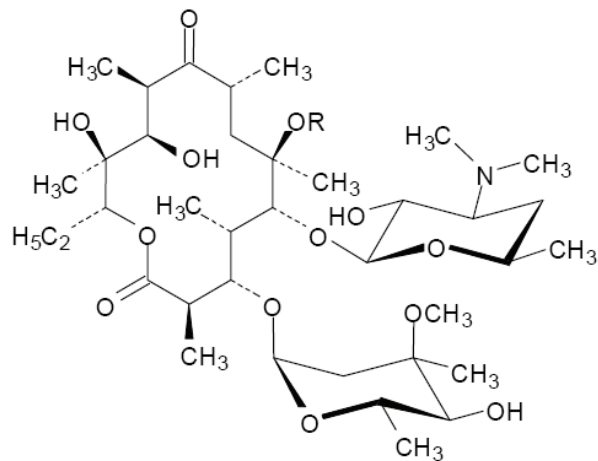


Abbildung 2-21: Strukturformel von Chloramphenicol (BLAC, 1999).

2.8.9 Clarithromycin

Die folgenden Angaben sind dem Landesumweltamt Brandenburg (2002), Feldmann (2005), molekula (2007) und der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Einordnung:	Makrolid-Antibiotikum (NLM, 2008)
Synonyme:	6-O-Methyl-Erythromycin A
Handelsname:	Biaxin, Clarithrobeta, Mavid, Clarithromycin Sandoz 125/250 (Sandoz, 2005)
CAS-nr.:	81103-11-9
Summenformel:	$C_{38}H_{69}NO_{13}$ (NLM, 2008)
Aggregatzustand:	weißes, kristallines Pulver
Molekulargewicht:	747,95 g/mol (Knox, 2008)
Wasserlöslichkeit:	0,33 mg/L (Knox, 2008)
Dampfdruck:	0 Pa
Henry-Konstante:	$0 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$
logK_{ow} :	2,6
BCF:	21,7
Toxizität:	LD_{50} (oral, Ratte): >6g/kg (Dauderer, 2000)



Clarithromycin R = CH₃

Abbildung 2-22: Strukturformel von Clarithromycin (BLAC, 1999).

2.8.10 Clenbuterol

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) sowie Dr. Ehrenstorfer (2006) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Es wurde Clenbuterol hydrochlorid untersucht, da dieses normalerweise in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt wird (EMA, 2000).

Wirkstoffklasse:	Benzolderivate
Zuordnung:	β_2 -Adrenorezeptor-Agonisten/ β -Sympathomimetika (Forth et al., 2001)
Synonyme:	4-Amino-3,5-dichloro- α -[[(1,1-dimethylethyl)amino]methyl]benzenmethanol
Handelsname:	Spiropent
CAS-nr.:	21898-19-1
Summenformel:	$C_{12}H_{18}Cl_2N_2O \cdot HCl$
Aggregatzustand:	farbloses, mikrokristallines Pulver
Molekulargewicht:	313,65 g/mol (Heitzman, 2006)
Wasserlöslichkeit:	sehr gut löslich (Heitzman, 2006)
logK_{ow}:	2,91 (Bazylak & Nagels, 2003)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 315 mg/kg

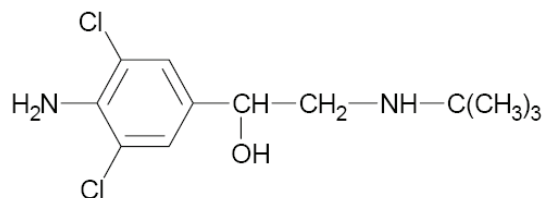


Abbildung 2-23: Strukturformel von Clenbuterol (BLAC, 1999).

2.8.11 Clofibrinsäure

Die folgenden Angaben sind dem Landesumweltamt Brandenburg (2002), Mersmann (2003) und den Sicherheitsdatenblättern für Chloramphenicol der Firmen, Alfa Aesar (2004a) sowie Acros Organics (1996a) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Phenoxyalkancarbonsäurederivate
Zuordnung:	Lipid-Senker (Metabolit)
Synonyme:	2-(4-Chlorphenoxy)-2-methyl-propionsäure
Handelsname:	Lipo-Merz®, Duolip®
CAS-nr.:	882-09-7
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃
Aggregatzustand:	weißes bis hellgelbes-braunes Pulver
Molekulargewicht:	214,65 g/mol
Wasserlöslichkeit:	582,5 mg/L
Dampfdruck:	1,13*10 ⁻⁴ mmHg
Henry-Konstante:	1,0*E-3 Pa m ³ /mol
logK_{ow} :	2,57
pK_a:	3,2
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Maus): 1170 mg/kg LD ₅₀ (oral, Ratte): 897mg/kg EC ₅₀ (0,5 h.): 100 mg/L, <i>Vibrio fischeri</i> (arge-elbe, 2003) EC ₅₀ (48h.):145 mg/L, <i>D. subspicatus</i> , (Cleuvers, 2002) EC ₅₀ (48h): 106 mg/L, <i>Daphnia magna</i> (arge-elbe, 2003) LC ₅₀ (48 h.): 86 mg/L, <i>D. rerio</i> (Henschel, 1997)

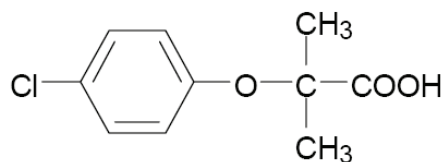


Abbildung 2-24: Strukturformel von Clofibrinsäure (BLAC, 1999)

2.8.12 Coffein

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) und dem Sicherheitsdatenblatt der Substanz der Firma Merck (2005) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Methylxanthine
Zuordnung:	Analgetika-Zusatz, Bestandteil von Genussmittel (Engelmann, 2005)
Synonyme:	1,3,7-trimethylxanthin
Handelsname:	Koffein, Thein, Guaranin
CAS-nr.:	58-08-2
Summenformel:	$C_8H_{10}N_4O_2$
Aggregatzustand:	farbloses, geruchloses Pulver; charakteristischer bitterer Geschmack
Molekulargewicht:	194,20 g/mol
Wasserlöslichkeit:	20 g/L (20°C)
Dampfdruck:	20hPa (80°C)
Dichte:	1,23 g/cm ³
logK_{ow}:	-0,07 (experimentell, Merck)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Maus): 127- 137 mg/kg EC ₅₀ (48h): 26,5 mg/L, <i>Daphnia spec.</i> LC ₅₀ (96h): 87 mg/L, <i>Leuciscus idus</i> (Roth, 2008) LC ₅₀ (96h):275 mg/L, <i>Poecilia reticulata</i>

Vorkommen:

Coffein kommt natürlicherweise v.a. in Beeren, Samen und Blättern der Kaffeepflanze (*Coffea arabica*), des Teestrauchs (*Camellia sinensis*), der Matepflanze (*Ilex paraguariensis*) sowie des Kakao- und Kolabaumes (*Theobroma cacao*, *Cola nitida*) vor (Bützer, 2003; Forth et al., 2001)

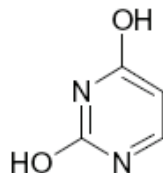


Abbildung 2-25: Strukturformel von Coffein (Sattelberger, 1999).

2.8.13 Cyclophosphamid

Die folgenden Angaben sind dem Landesumweltamt Brandenburg (2002), Rebmann (2004b), Kohl (2002) und Baxter (2003) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Oxazaphosphorine
Zuordnung:	bifunktionelle alkylierende Zytostatika (Forth et al.), 2001), Stickstofflost- Derivate
Synonyme:	2-(Bis(2-chlorethyl)amino)tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid
Handelsname:	Endoxan®, Motixan, Genoxal, Cytophosphan
CAS-nr.:	50-18-0
Summenformel:	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$
Aggregatzustand:	weißes, kristallines Pulver
Molekulargewicht:	279,1 g/mol
Wasserlöslichkeit:	40000 mg/L
Dampfdruck:	0,000033 hPa
Henry-Konstante:	$1,4 \cdot 10^{-11}$ atm m ³ /mol
logK_{ow} :	0,63
BCF:	1,8 (geschätzt)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 342 mg/kg NOEC (48h): >987 mg/L, <i>Daphnia magna</i> NOEC (96 h.): > 984 mg/L, <i>Salmo gairdneri</i>

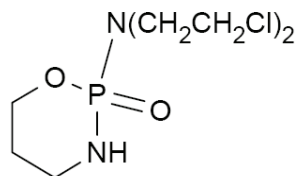


Abbildung 2-26: Strukturformel von Cyclophosphamid (BLAC, 1999).

2.8.14 Diclofenac

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch), Mersmann (2003), dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Calbiochem (2005) sowie dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Aufgrund der besseren Wasserlöslichkeit wurde Diclofenac Natrium verwendet.

Wirkstoffklasse:	(Phenyl-)Essigsäurederivate
Einordnung:	Rheumatikum/ saure antipyretisch-antiphlogistische Analgetika (Forth et al., 2001)
Synonyme:	2[(2,6-Dichlorophenyl)amino]benzenessigsäure
Handelsnamen:	Voltaren, Athrax
CAS-nr.:	15307-79-6
Summenformel:	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2 \cdot Na$
Aggregatzustand:	pulverförmiger, weißer bis hellgelber Feststoff
Molekulargewicht:	318,1 g/mol
Dampfdruck:	$2,6 \cdot 10^{-6}$ Pa
Henry-Konstante:	$2,7 \cdot 10^{-6}$ Pa \cdot m ³ /mol
Wasserlöslichkeit:	21300 mg/L (25°C)
pKa:	4,0
logK_{ow}:	1,13-1,56
BCF:	1,183 (Diclofenac)
Toxizität:	LC ₅₀ (96h): 214 mg/L <i>Danio rerio</i>

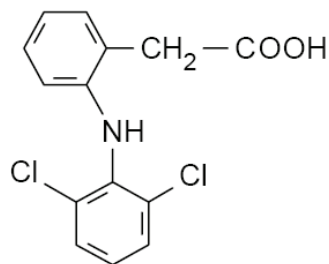
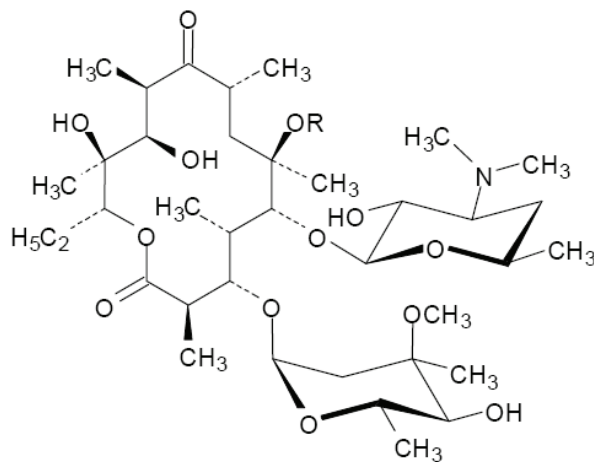


Abbildung 2-27: Strukturformel von Diclofenac (BLAC, 1999).

2.8.15 Erythromycin

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) und dem Sicherheitsdatenblatt der Substanz der Firma Acros Organics (2005) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Makrolid-Antibiotika
Zuordnung:	Antibiotika (Halling- Sorensen et al., 1998)
Handelsname:	Erythrocyne, Eryaknen, Eryderm, Erythrocin® i.v. (Abbott, 2004)
CAS-nr.:	114-07-8
Summenformel:	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃ (Volger & Schneider, 2006)
Aggregatzustand:	bitter schmeckendes, geruchloses, weißes bis schwach gelbes, kristallines Pulver
Molekulargewicht:	733.94 g/mol (Volger & Schneider, 2006)
Wasserlöslichkeit:	1 mg löslich in 1 ml Wasser
pKa:	8,7-8,8
logK_{ow} :	3,06 (Feldmann, 2005)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 374 mg/kg EC ₅₀ (24h): 388 mg/L, <i>D. magna</i> ,(arge-elbe, 2003)



Erythromycin R = H

Abbildung 2-28: Strukturformel von Erythromycin (BLAC, 1999).

2.8.16 17- α -Ethinylöstradiol

Die folgenden Angaben sind dem Landesumweltamt Brandenburg (2002), Liebig (2005) und Rippen (1990) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Synthetische Steroidhormone
Einordnung:	orale Kontrazeptiva (Daughton und Ternes, 1999)
Synonyme:	EE2, 17 α -ethynyl-1,3,5[10]-estratriene-3,17b-diol
CAS-nr.:	57-63-6
Summenformel:	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
Aggregatzustand:	Feststoff (Sigma-Aldrich, 2006b)
Molekulargewicht:	296,44 g/mol
Dampfdruck:	3,8*E-7 Pa
Henry-Konstante:	2,9*E-7 Pa*m ³ /mol
Wasserlöslichkeit:	12 – 18,6 mg/L (20-25 °C)
pKa:	10,46 (23°C)
logK_{ow}:	4,2
BCF:	492
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 960 mg/kg (Sigma-Aldrich, 2006b) EC ₅₀ (24h): 5,7 mg/L, <i>Daphnia magna</i> , LC ₅₀ (96h): 1,7 mg/L, <i>Danio rerio</i>

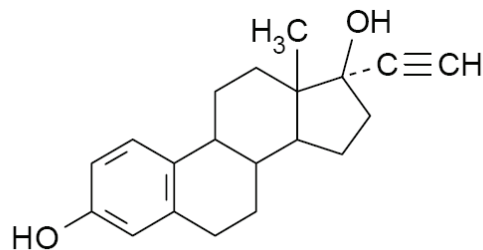


Abbildung 2-29: Strukturformel von 17- α -Ethinylöstradiol (EE₂, BLAC, 1999).

2.8.17 Fenofibrat

Die folgenden Angaben sind dem Landesumweltamt Brandenburg (2002), dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Sigma Aldrich (2006b) sowie der Produktinformation von Cayman Chemicals (2007) und Daughton & Ternes (1999) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Fibrate (Forth et al., 2001), Fibrinsäurederivat (Fournier, 2004)
Zuordnung:	Lipid-Senker (Daughton und Ternes, 1999)
Synonyme:	2-[4-[4-chlorobenzoyl]phenoxy]-2-methylpropanoic acid 1-methylethyl ester
Handelsname:	Lipanthyl® 200M/267M/100 (Fournier, 2004)
CAS-nr.:	49562-28-9
Summenformel:	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄
Aggregatzustand:	kristalliner Feststoff
Molekulargewicht:	360,8 g/mol
Wasserlöslichkeit:	gering
Dampfdruck:	2,8*E-8 Pa (FS) ⁷
Henry-Konstante:	4,6*E-7 Pa*m ³ /mol (FS) ¹²
logK_{ow}:	4,3 (FS) ¹²
BCF:	896,4 (FS) ¹²
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): >2000 mg/kg LD ₅₀ (oral, Maus): 1600 mg/kg

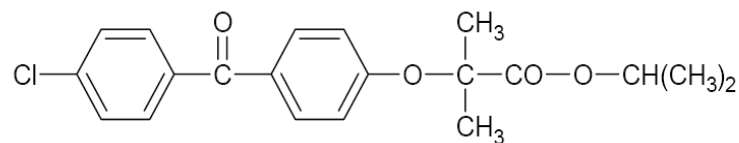


Abbildung 2-30: Strukturformel von Fenofibrat (BLAC, 1999).

⁷ FS: Angaben für Fenofibrinsäure

2.8.18 Ibuprofen

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch), Mersmann (2003) und dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Sigma-Aldrich (2006c) sowie dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der reinen Substanz wurde Ibuprofen-Natrium untersucht.

Wirkstoffklasse:	(Phenyl)Propionsäurederivat
Einordnung:	Antirheumatikum/ saure antipyretisch-antiphlogistische Analgetika (Forth et al., 2001)
Synonyme:	2-(4-Isobutylphenyl)-Propionsäure
Handelsnamen:	Dolormin, Profen
CAS-nr.:	31121-93-4
Summenformel:	C ₁₃ H ₁₇ NaO ₂
Aggregatzustand:	weißer Feststoff
Molekulargewicht:	228,29 g/mol
Wasserlöslichkeit:	2,44 mg/L (Ibu) ⁸
Dampfdruck:	1,86*10 ⁻⁴ mmHg (Ibu) ⁸
pKa:	4,5, 5,7 (Ibu) ⁸
logK_{ow}:	3,5 (Ibu) ⁸
Toxizität:	LC ₅₀ (96h): 173 mg/L, <i>L. macrochirus</i>

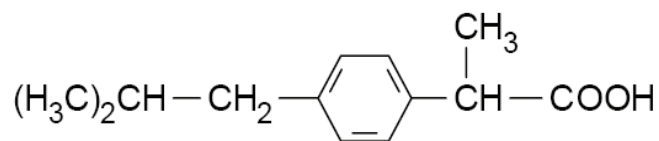


Abbildung 2-31: Strukturformel von Ibuprofen (BLAC, 1999).

⁸ Ibu: Wert für die reine Substanz

2.8.19 Ifosfamid

Die folgenden Angaben sind dem Landesumweltamt Brandenburg (2002), Kohl (2002) und Baxter (2004) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Oxazaphosphorine
Zuordnung:	Zytostatikum, Stickstofflost-Derivat
Synonyme:	3-(2-Chlorethyl)-2-[(2-chlorethyl)amino]-2H-1,3,2-oxazaphosphinan-2-oxid
Handelsname:	Holoxan
CAS-nr.:	3778-73-2
Summenformel:	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P
Aggregatzustand:	weißes, kristallines, geruchloses Pulver
Molekulargewicht:	261,1 g/mol
Wasserlöslichkeit:	100 g/L
Dampfdruck:	0,000014 hPa
Henry-Konstante:	8,1*E-6 Pa*m ³ /mol
logK_{ow} :	0,9
BCF:	0,4
Toxizität:	EC ₅₀ (48h): 162 mg/L, <i>Daphnia magna</i> NOEC(48h): 100 mg/L, <i>Daphnia magna</i> LC ₅₀ (96h): >1000 mg/L, <i>Salmo gairdneri</i> NOEC(96h): 555 mg/L, <i>Salmo gairdneri</i>

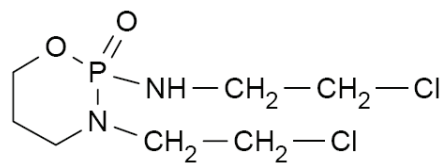


Abbildung 2-32: Strukturformel von Ifosfamid (BLAC, 1999).

2.8.20 Malathion

Die folgenden Angaben sind Streit (1992), Dr. Ehrenstorfer (2003) und Schulte (1997) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Einordnung:	Thiophosphorsäureester, Insektizid
Synonyme:	S-[1,2-Bis(ethoxycarboxyl)ethyl]-O,O-dimethyl-dithiophosphat
CAS-nr.:	121-75-5
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Aggregatzustand:	ölige, gelbliche Flüssigkeit; markanter Geruch nach Knoblauch
Molekulargewicht:	330.36 g/mol
Wasserlöslichkeit:	145 mg/L (25°C)
Dichte:	1,23 (25°C)
Dampfdruck:	17 mPa (20°C)
logK_{ow} :	2,9
Toxizität:	LD ₅₀ (oral): 1,4 – 2,8g/kg; Ratte LC ₅₀ (96h): 0,103 mg/L, <i>Lepomis macrochirus</i> LC ₅₀ (96h): 0,122 mg/l, <i>Onchorhynchus mykiss</i> LC ₅₀ (48h): 6,2 mg/L, <i>Danio rerio</i> (DarT)

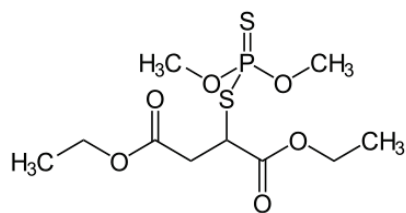


Abbildung 2-33: Strukturformel von Malathion (wikipedia, 2008).

2.8.21 Metoprolol

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) sowie Dr. Ehrenstorfer (2005a) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Es wurde Metoprolol tartrat verwendet.

Wirkstoffklasse:	Propanole
Zuordnung:	β -Blocker (AstraZeneca, 2003; Sankyo, 2004)
Synonyme:	1-[4-(2-Methoxyethyl)phenoxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-propanol tartrat
Handelsname:	Beloc ZOK® (AstraZeneca, 2003), Lopresor® OROS (Sankyo, 2004)
CAS-nr.:	56392-17-7
Summenformel:	$C_{34}H_{56}N_2O_{12}$
Aggregatzustand:	kristalliner Feststoff, bitterer Geschmack
Molekulargewicht:	684,8 g/mol
Wasserlöslichkeit:	leicht löslich (>1000 mg/L)
logK_{ow}:	1,88 (Barcelo et al., 2006)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 3090 mg/kg

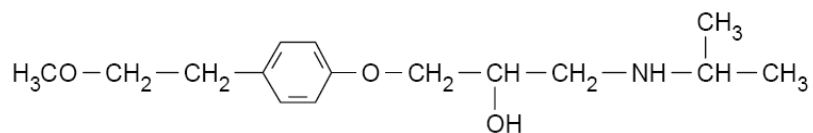


Abbildung 2-34: Strukturformel von Metoprolol (BLAC, 1999).

2.8.22 Naproxen

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) sowie dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Sigma- Aldrich (2006d) und dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der reinen Substanz wurde Naproxen Natrium verwendet.

Wirkstoffklasse:	Propionsäurederivate
Einordnung:	Antiphlogistikum, Antirheumatikum, (Engelmann et al., 2005) Antipyretikum (Mepha Pharma, 1997), nicht-steroidale Analgetika (Forth et al., 2001)
Synonyme:	6-Methoxy-alpha-Methyl-2-Naphthalen-Acetylsäure
Handelsnamen:	Naprosyn, Proxen, Naproxen-Mepha® (Mepha Pharma, 1997)
CAS-nr.:	26159-34-2
Summenformel:	C ₁₄ H ₁₃ NaO ₃
Aggregatzustand:	fast weißes Pulver
Molekulargewicht:	252,24 g/mol
Wasserlöslichkeit:	praktisch unlöslich (Nap ⁹)
logK_{ow}:	3,0 (Nap ⁹)
Dampfdruck:	6,7*E-5 Pa (Nap ⁹)
Henry-Konstante:	2,1*E-5 Pa*m ³ /mol (Nap ⁹)
pKa:	4,14 (Nap ⁹)
BCF:	45,5 (Nap ⁹)
Toxizität:	EC ₅₀ (24h): 140 mg/L, <i>Daphnia magna</i> LC ₅₀ (96h): 690 mg/L, <i>Onchorhynchus mykiss</i> LC ₅₀ (96h): 560 mg/L, <i>Lepomis macrochirus</i>

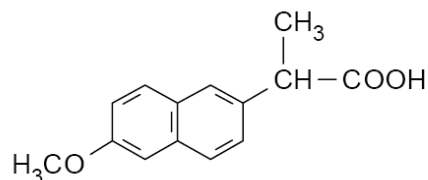


Abbildung 2-35: Strukturformel von Naproxen (BLAC, 1999).

⁹ Nap: Angaben der reinen Substanz

2.8.23 Oxytetracyclin

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch), dem Sicherheitsdatenblatt der Firmen Acros Organics (2005) und Sigma-Aldrich (2008b) sowie Rippen (1990) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Aufgrund der besseren Wasserlöslichkeit wurde Oxytetracyclin hydrochlorid verwendet.

Wirkstoffklasse:	Tetracycline
Zuordnung:	Antibiotika (Halling- Sorensen et al., 1998)
Synonyme:	(2Z,4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-2-(amino-hydroxymethylidene)-4-dimethylamino-5,6,10,11,12a-pentahydroxy-6-methyl-4,4a,5,5a-tetrahydrotetracene-1,3,12-trione (Knox, 2005)
Handelsname:	Glomycin, Riomitsin, Oxytetracyclin-Augensalbe (JENAPHARM, 2005)
CAS-nr.:	2058-46-0
Summenformel:	$C_{22}H_{24}N_2O_9$ HCl
Aggregatzustand:	beiges bis hellgelbes, kristallines Pulver, bitterer Geschmack
Molekulargewicht:	496,9 g/mol
Wasserlöslichkeit:	0,6 mg/mL als reine Substanz (schwer löslich), 6,9 mg/mL bzw., frei löslich als HCl (Knox, 2008)
logK_{ow} :	-1,3 (Knox, 2008)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Maus): 3600- 7200 mg/kg

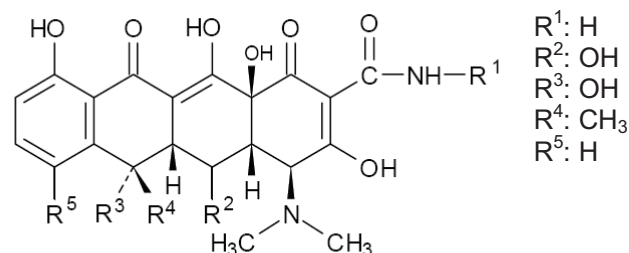


Abbildung 2-36: Strukturformel von Oxytetracyclin (BLAC, 1999).

2.8.24 Paracetamol

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch), dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) sowie den Sicherheitsdatenblättern der Firmen Merck (2003c) und Alfa Aesar (2004c) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	p-Aminophenolderivate
Einordnung:	nicht-saure antipyretische Analgetika (Forth et al., 2001)
Synonyme:	N-Acetyl-p-Aminophenol, Acetaminophen, 4-Acetamidophenol
Handelsnamen:	Grippostad, Zolben Treupel®Dolo PARACETAMOL (Viartis GmbH, 2003)
CAS-nr.:	103-90-2
Summenformel:	C ₈ H ₉ NO ₂
Aggregatzustand:	kristallines, weißes Pulver, leicht bitterer Geschmack; geruchlos
Molekulargewicht:	151,17 g/mol
Wasserlöslichkeit:	14 g/L
Dichte:	1,293 g/cm ³ (20°C)
logK_{ow}:	0,51
BCF:	0,1
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 1944 mg/kg LC ₅₀ (48h.): 378 mg/L <i>Danio rerio</i> EC ₅₀ (48h.): 50 mg/L <i>Daphnia magna</i>

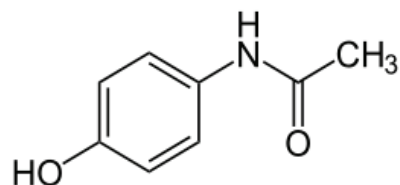


Abbildung 2-37: Strukturformel von Paracetamol (wikipedia, 2008).

2.8.25 Parathion

Die folgenden Angaben sind Streit (1992) und Dr. Ehrenstorfer (2002) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Es wurde Parathion-methyl verwendet.

Einordnung:	Thiophosphorsäureester; Organophosphorverbindung, Insektizide
Synonyme:	O,O-Dimethyl-O-(4-nitrophenyl)-phosphorothioate, E605
CAS-nr.:	298-00-0
Summenformel:	$C_8H_{10}O_5NO_5PS$
Aggregatzustand:	unterhalb von 6,1°C Feststoff, darüber flüssig (Parathion)
Molekulargewicht:	263,21 g/mol
Wasserlöslichkeit:	55 mg/L (20°C)
Dichte:	1,265 (Parathion)
Dampfdruck:	7,68 mPa (20°C, Parathion)
logK_{ow} :	3,8 (Parathion)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 6 mg/kg LC ₅₀ (96h): 1,5 mg/L, Regenbogenforelle (Parathion)

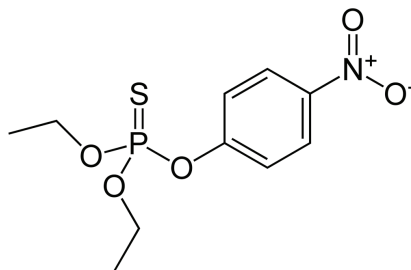


Abbildung 2-38: Strukturformel von Parathion (wikipedia, 2008).

2.8.26 Propranolol

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) und dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Da es in der Humanmedizin v.a. zum Einsatz kommt (Inderal®, AstraZeneca, 2002; Propranolol Helvepharm, Helvepharm, 1991) wurde Propranolol hydrochlorid verwendet. Die Substanz ist zudem besser wasserlöslich und hat einen niedrigeren $\log K_{ow}$ als die reine Substanz.

Wirkstoffklasse:	Naphthalinderivat
Einordnung:	lipophiler, unspezifischer β -Blocker
Synonyme:	(±)-1-Isopropylamino-3-(1-naphthyloxy)-2-propanol hydrochloride (Sigma-Aldrich, 2008)
Handelsname:	Inderal® (Astra Zeneca, 2002), Propranolol Helvepharm (Helvepharm, 1991)
CAS-nr.:	318-98-9 / 4199-10-4
Summenformel:	$C_{16}H_{21}NO_2$ (Daughton und Ternes, 1999)
Aggregatzustand:	bitter schmeckendes, geruchloses, weißes Pulver
Molekulargewicht:	295,8 g/mol (Rxlist, 2008)
Wasserlöslichkeit:	1g löst sich in 20ml Wasser
pKa:	9,45
$\log K_{ow}$:	2,7
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Maus): 289 mg/kg LC ₅₀ (24h): 2,7 mg/L <i>Daphnia magna</i>

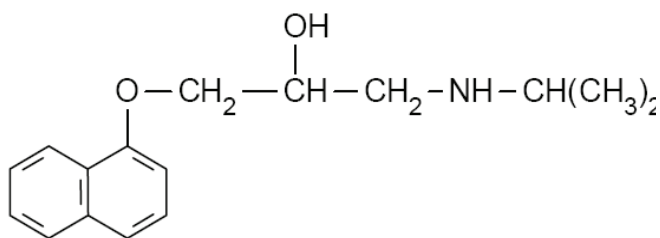


Abbildung 2-39: Strukturformel von Propranolol (BLAC, 1999).

2.8.27 Roxithromycin

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch), Knox (2008) und dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Makrolide
Einordnung:	Antibiotika
Synonyme:	(3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14R)-6-[(2S,3R,4S,6R)-4-dimethylamino-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-4-[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-10-(2-methoxyethoxymethoxyimino)-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-1-oxacyclotetradecan-2-one
Handelsname:	Roxi, Roxibeta, Roxigrün, Rulid® (Aventis Pharma, 2001)
CAS-nr.:	80214-83-1
Summenformel:	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅
Aggregatzustand:	weißer Feststoff (molekular, 2007)
Molekulargewicht:	837,05 g/mol
Wasserlöslichkeit:	0,0189 mg/L (25°C)
Dampfdruck:	0 Pa
logK_{ow}:	2,5
BCF:	15,2
Toxizität:	LC ₅₀ (96h): >100 mg/L Fischespezies nicht benannt

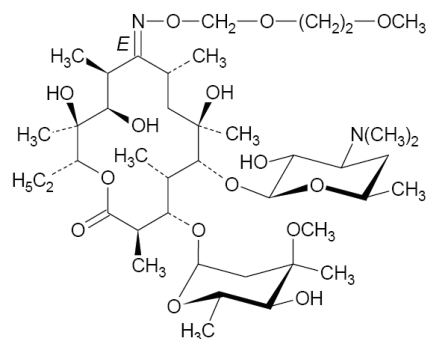


Abbildung 2-40: Strukturformel von Roxithromycin (BLAC, 1999).

2.8.28 Salbutamol

Die folgenden Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Sigma-Aldrich/ Riedel de Haen (2007) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Es wurde Salbutamol hemisulfat verwendet.

Wirkstoffklasse:	Benzolderivate
Einordnung:	β -Sympathomimetika (Glaxosmithkline, 2004)
Synonyme:	4-[2-(tert-butylamino)-1-hydroxyethyl]-2-(hydroxymethyl)phenol (Knox, 2008)
Handelsnamen:	Volmax® (Glaxosmithkline, 2004)
CAS-nr.:	51022-70-9
Summenformel:	$C_{13}H_{21}NO_3 \cdot 0,5 H_2SO_4$
Aggregatzustand:	weißer Feststoff (Sigma-Aldrich, 2006e)
Molekulargewicht:	288,36 g/mol
Wasserlöslichkeit:	3 mg/L (Salbutamol)
logK_{ow}:	0,01 (arge-elbe, 2002)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): >2500 mg/kg (Sigma-Aldrich, 2006e)

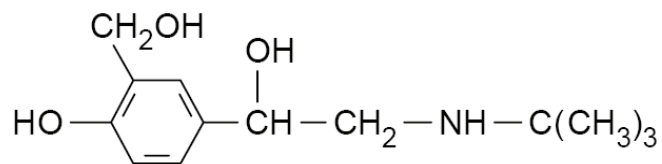


Abbildung 2-41: Strukturformel von Salbutamol (BLAC, 1999).

2.8.29 Sulfamethoxazol

Die folgenden Angaben sind Forth et al. (2001), Liebig (2005) sowie der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Sulfonamide
Einordnung:	Antibiotika (Halling- Sorensen et al., 1998)
Synonyme:	4-Amino-N-(5-methyl-3-isoxazolyl)benzensulfonamid
Handelsnamen:	Groprim® (Grossman, 2002)
CAS-nr.:	723-46-6
Summenformel:	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Aggregatzustand:	weißes bis cremefarbiges, geruchloses Pulver
Molekulargewicht:	253,3 g/mol
Wasserlöslichkeit:	610 mg/L (25°C)
pKa:	5,6
logK_{ow}:	0,89
Toxizität:	EC ₅₀ (48h): 125 mg/L, <i>Daphnia magna</i> , LC ₅₀ (48h): >100 mg/L, <i>Danio rerio</i> (DarT)

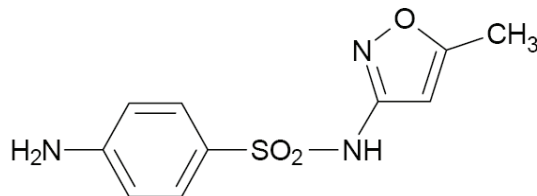


Abbildung 2-42: Strukturformel von Sulfamethoxazol (BLAC, 1999).

2.8.30 Tamoxifen

Die folgenden Angaben sind Forth et al. (2001) sowie den Sicherheitsdatenblättern der Firmen Calbiochem (2003), Acros Organics (2000) und Dr. Ehrenstorfer (2005c) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Es wurde Tamoxifen citrat verwendet

Wirkstoffklasse:	Triphenylethen-Derivat (Forth et al., 2001)
Einordnung:	Zytostatische Hormone
Synonyme:	(Z)-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl)-phenoxy]-N,N-dimethylethylamin (Klaua, 2004)
Handelsnamen:	Tamoxifen Farnos (Bristol-Myers Squibb, 2003)
CAS-nr.:	54965-24-1
Summenformel:	$C_{26}H_{29}NO \cdot C_6H_8O_7$
Aggregatzustand:	weißes, geruchloses, kristallines Pulver
Molekulargewicht:	563,7 g/mol
Wasserlöslichkeit:	schlecht löslich
logK_{ow}:	6,3 (Sandra et al., 2003)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 1190 mg/kg

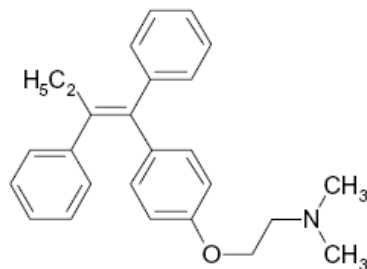


Abbildung 2-43: Strukturformel von Tamoxifen (Sattelberger, 1999).

2.8.31 Terbutalin

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) und dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Sigma- Aldrich (2006f) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Es wurde Terbutalin hemisulfat verwendet.

Wirkstoffklasse:	Benzolderivate
Einordnung:	β -Sympathomimetika
Synonyme:	5-[2-[(1,1-Dimethylethyl)amino]-1-hydroxyethyl]-1,3-benzendiol
Handelsname:	Bricanyl® (AstraZeneca, 1992), Aerodur, Continit
CAS-nr.:	23031-32-5
Summenformel:	$C_{12}H_{19}NO_3 \cdot 0,5 H_2SO_4$
Aggregatzustand:	Feststoff
Molekulargewicht:	274,3 g/mol
Wasserlöslichkeit:	1213 mg/L (Knox, 2008)
logK_{ow}:	1,4 (Knox, 2008)
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 8700 mg/kg LD ₅₀ (oral, Hund): 1520 mg/kg

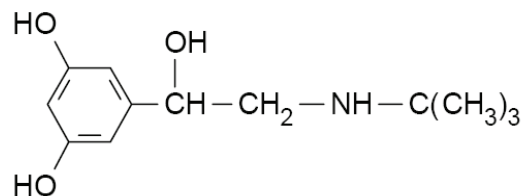


Abbildung 2-44: Strukturformel von Terbutalin (BLAC, 1999).

2.8.32 Theophyllin

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch), dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) sowie den Sicherheitsdatenblättern der Firmen Acros Organics (1996c) und Caelo (2005) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Methylxanthine
Einordnung:	zentrale Analeptika, Bronchospasmolytika/ Antiasthmatika
Synonyme:	1,3-Dimethyl-xanthin
Handelsname:	Theo-CT, Duraphyllin, Euphyllin®N (Altana Pharma, 2004)
CAS-nr.:	58-55-9
Summenformel:	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂
Aggregatzustand:	weißes, kristallines Pulver; bitterer Geschmack (Zeller, 1995)
Molekulargewicht:	180,17 g/mol
Wasserlöslichkeit:	1g löst sich in 120ml Wasser, 8,3 g/L (20°C)
Dampfdruck:	3,2*E-6 Pa
Henry-Konstante:	8,617*10 ⁻²⁰ atm*m ³ /mol
logK_{ow}:	-0,02
BCF:	0,6
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 225 mg/kg

Vorkommen: Das Purin-Derivat Theophyllin kommt, ähnlich wie Coffein, natürlicherweise in den Beeren, Samen und Blättern der Kaffeepflanze (*Coffea arabica*), des Teestrauchs (*Camellia sinensis*), der Matepflanze (*Ilex paraguariensis*) sowie des Kakao- und Kolabaumes (*Theobroma cacao*, *Cola nitida*) vor (Bützer, 2003; Forth et al., 2001)

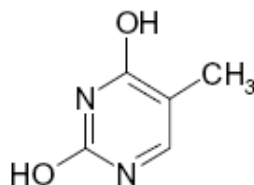


Abbildung 2-45: Strukturformel von Theophyllin (Sattelberger, 1999).

2.8.33 Trimethoprim

Die folgenden Angaben sind Forth et al. (2001) und der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) sowie dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Science Lab.com (2005) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Benzylpyrimidine / Diaminopyrimidinderivate
Einordnung:	Dihydrofolat-Reduktasehemmer/ Folsäureantagonist
Synonyme:	2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-pyrimidin
Handelsname:	Infectotrimet, Groprim® (Grossman, 2002)
CAS-nr.:	738-70-5
Summenformel:	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃ (Serva, 2005)
Aggregatzustand:	weißes bis cremefarbenes, kristallines geruchloses Pulver, bitterer Geschmack
Molekulargewicht:	290,32 g/mol (Serva, 2005)
Wasserlöslichkeit:	400 mg/100 ml (25°C)
pKa:	6,6
logK_{ow}:	0,9
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Maus): 2764 mg/kg

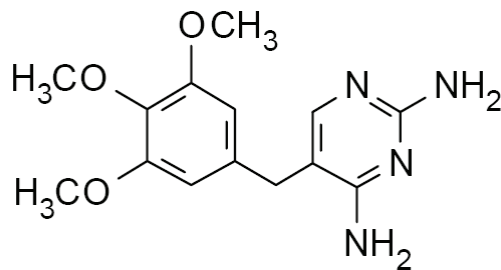


Abbildung 2-46: Strukturformel von Trimethoprim (BLAC, 1999).

2.8.34 Valproinsäure

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch) und den Sicherheitsdatenblättern der Firmen Merck (2002c) und Acros Organics (2004) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet.

Wirkstoffklasse:	Carboxylsäurederivate
Einordnung:	Antiepiletika
Synonyme:	2-Propylvaleriansäure, Dipropyllessigsäure, 2-Propylenpentansäure
Handelsnamen:	Depakine®Chrono (Sanofi-Synthelabo)
CAS-nr.:	99-66-1
Summenformel:	C ₈ H ₁₆ O ₂
Aggregatzustand:	farblose bis gelbliche, klare Flüssigkeit (20°C)
Molekulargewicht:	144.21 g/mol
Wasserlöslichkeit:	gering
Dichte:	0,91 g/cm ³
Log k_{ow} :	2,75
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Ratte): 670 mg/kg LD ₅₀ (oral, Maus): 1098 mg/kg LC ₅₀ (48h): 20,19 mg/L; <i>Danio rerio</i> , (Bachmann, 2002)

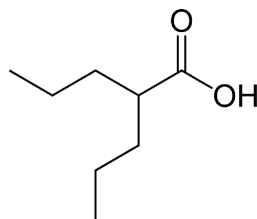


Abbildung 2-47: Strukturformel von Valproinsäure (wikipedia, 2008).

2.8.35 Verapamil

Die folgenden Angaben sind der Website der Universität Zürich (www.vetpharm.unizh.ch), dem Landesumweltamt Brandenburg (2002) sowie Zeller (1995) und Tocris biosciences (2006) entnommen. Andere Quellen sind entsprechend gekennzeichnet. Es wurde Verapamil hydrochlorid verwendet.

Wirkstoffklasse:	Benzolderivate
Einordnung:	Calciumkanal-Blocker, Antihypertonikum
Synonyme:	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl-methylamino]-2-propan-2-ylpentanenitrile (Knox, 2008)
Handelsnamen:	Flamon, Verapam®/-retard (Streuli, 1998)
CAS-nr.:	52-53-9
Summenformel:	$C_{17}H_{38}N_2O_4 \text{ HCl} * 0,5 \text{ H}_2\text{O}$
Aggregatzustand:	weißes, geruchloses, bitter schmeckendes Pulver
Molekulargewicht:	500,08
Wasserlöslichkeit:	83mg/L
Dampfdruck:	$2,2 * E^{-12}$ Pa
Henry-Konstante:	$3,2 * E^{-9}$ Pa*m ³ /mol
logK_{ow}:	4,6
BCF:	2152,8
Toxizität:	LD ₅₀ (oral, Maus): 163 mg/kg EC ₅₀ (24h): 55,5 mg/L, <i>Daphnia magna</i> LC ₅₀ (96hl): >4,6 mg/L / <10 mg/L, <i>Leuciscus idus</i>

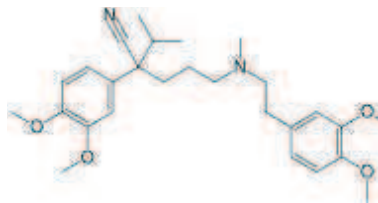


Abbildung 2-48: Strukturformel von Verapamil (wikipedia, 2008).

2.9 Datenaufbereitung und Versuchsauswertung

Nach Beendigung der Versuche erfolgte die Bewertung der beobachteten Effekte der Testsubstanzen auf die Embryonalentwicklung. Der Versuch galt als valide, wenn maximal 10% der Embryonen in den Kontrollen nach 48 Stunden letale und maximal 20% der Kontrollembryonen nach 48 Stunden subletale Effekte zeigten. War die Mortalität bzw. der Anteil subletaler Effekte höher, wurde der Versuch wiederholt.

2.9.1 LC₅₀-Bestimmung (letale Konzentration)

Durch eine Ja/ Nein-Entscheidung wurde das Vorhandensein letaler Effekte beurteilt. Anhand der erhaltenen Daten wurde mit dem Tox Rat®- Programm (Tox Rat Professional, Version 2.07) die Konzentration ermittelt, bei der 50 % der Versuchsorganismen innerhalb eines festgelegten Versuchszeitraumes (48 Stunden) letale Effekte zeigten (LC₅₀(48h)). In Anlehnung an den best fit-approach nach Scholze et al. (2001) wurden dafür die drei in der Ökotoxikologie gebräuchlichsten Standardmodelle, Logit, Probit (Lichtenfeld-Wilcoxon, 1949), Weibull, an die Daten angepasst. Für jede Substanz bzw. Substanzkombination wurde dann das „best fitting“-Modell auf Basis statistischer Kriterien ausgewählt.

2.9.2 EC₅₀-Bestimmung (Effektkonzentration)

Auch das Auftreten der verschiedenen subletalen Effekte unterlag einer Ja/Nein- Entscheidung. Anhand dieser Daten wurde ebenfalls mittels Logit-, Weibull- oder Probit-Analyse die Konzentration bestimmt, bei der 50 % der untersuchten Organismen innerhalb eines festgelegten Zeitraumes (48 Stunden) einen bestimmten Effekt zeigten (EC₅₀(48h)).

2.9.3 Bestimmung von NOEC und LOEC

Als einziger quantitativer Parameter wurde die Herzschlagfrequenz nach 48 Stunden bestimmt. Anhand dieser Daten wurden mittels Williams oder Dunetts-Test Angaben zu NOEC und LOEC abgeleitet, die auf dem 95%-Signifikanzniveau ermittelt wurden. Die NOEC ist dabei die höchste untersuchte Konzentration, bei der kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe auftritt. Die LOEC ist die niedrigste untersuchte Konzentration, bei der ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden kann.

2.9.4 Bestimmung LD₅₀*

Um die ermittelten Daten besser miteinander und mit Daten aus Toxizitätsuntersuchungen mit Ratten und Mäusen vergleichen zu können, wurde anhand der, mittels Tox Rat® kalkulierten LC₅₀-Werte die LD₅₀* berechnet. Dabei handelt es sich um die letale Dosis eines bestimmten Stoffes, d.h. die Menge eines Stoffes, die zugeführt werden muss, damit 50% der eingesetzten Testorganismen letale Effekte zeigen. Die LC₅₀ ist im Gegensatz dazu eine aus der Umgebung des exponierten Testorganismus wirkende Stoffkonzentration.

Die Berechnung der LD₅₀* erfolgt nach Brust (2001) über den Biokonzentrationsfaktor (BCF) einer Substanz. Dieser wiederum wird mathematisch über den logK_{ow} des Stoffes ermittelt.

$$\log\text{BCF} = 0,461 * \log\text{K}_{\text{ow}} + 0,0769 \quad \text{Gleichung 9}$$

Der ermittelte BCF wird dann zusammen mit der berechneten LC₅₀ aus den Einzelsubstanzversuchen für die Berechnung der LD₅₀* herangezogen.

$$\log\text{LD}_{50} = \log\text{LC}_{50} + \log\text{BCF} \quad \text{oder} \quad \text{LD}_{50} = \text{LC}_{50} * \text{BCF} \quad \text{Gleichung 10}$$

2.9.5 Darstellung der Mischungstoxizität

Die gemeinsamen Darstellungen der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der untersuchten Mischungen und der Vorhersagen nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* wurde mit dem drc-package des Programmes R (Ritz und Streibig, 2005) erstellt.

2.10 Geräte und Materialien

Nachfolgend sind die verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt.

2.10.1 Hälterung und Ei-Gewinnung

- ♦ Glasaquarien (Silikonfugen, 2 x L80xB40xH30cm; 2 x L70xB40xH40cm, 1 x L80xB40xH30cm)
- ♦ Aktivkohle- und Partikelfilter (Fa. Wolfert)
- ♦ Aquarienaußen- bzw. Anhängenfilter (Eheim Liberty 130 (220 - 570L/h; 230V, 50 Hz); Eheim Aquaboss (200-400L/h, 4 Watt, 50Hz))

- ♦ Leuchtstoffröhren (Sylvania Standard F58 W/ 125- T8, universal white; F58W/25; DAKS 18 W, cool white; Leuci, Aquarium light LT 18 Watt; Osram , Lumilux, cool white, 58 W)
- ♦ Aquarien-Durchlüfter (Rena Air 100 (120L/h, 150 mbar); Rena Air 400 (2x200L/h; 2x300 mbar))
- ♦ Futterautomat (Grässlin, 28 Futterbehälter, je 3,5 mL Füllvolumen)
- ♦ Laichschalen (Glas, L x B x H: 30 x 18 x 6 cm)
- ♦ Abdeckgitter (Edelstahl, Maschenweite ca. 3 mm, Werkstätten TU Dresden)
- ♦ Pflanzenimitate (Glasbäumchen: Firma Annemüller, Mainz, Deutschland; Kunststoffpflanzen: TetraPlantastics, Rote Ludwiegie, 11-15 cm)
- ♦ Aquarienheizer (Jäger, Deutschland)
- ♦ Thermostat (Lauda, Einhängethermostat, E100, Ecoline Staredition)
- ♦ Schlauch (Zulauf: 4/6 mm; Ablauf: 9/12 mm), Zuläufe (Lufthahn 2 weg 4/6 mm) Glas-Abflüsse, Dichtband (PTFE, VWR)
- ♦ TetraMin (Tetra-Werke, Melle, Deutschland)
- ♦ Zysten von *Artemia salina* (Sanders Brine Shrimp Company, Inc., Ogden, Utah, USA)
- ♦ Salz für Artemienansatz (Sea Salt Sera Premium, Sera-Werke; alternativ: jodfreies Speisesalz z.B. K-classic Tafelsalz)
- ♦ Ansetzkolben (Scheidetrichter, Duran Schott, Mainz, 500 und 1000 mL)
- ♦ Quetschhähne (Messing, vernickelt)
- ♦ Kastensieb (Fa. Hobby, 5x5 cm Siebfläche)
- ♦ Schnelltests (Aqua Quick Test (pH, KH/ TAC, GH/TH, NO₂, NO₃; eSHa Production, Maastricht, the Neverlands); Tetra^{test} O₂ (Tetra Werke, Melle, Deutschland))
- ♦ Ölradiator (Einhell, MR 510; ISC GmbH, Landau, Deutschland)

2.10.2 Ei-Entnahme und Probenansatz

- ♦ Kunststoff- Haushaltssieb („Sonja“, Maschenweite: 0,5 mm; Durchmesser: 60mm)
- ♦ Flachbodenschale aus Glas (Duran Schott; Durchmesser: 115 mm, Nennvolumen: 320 mL)
- ♦ Bechergläser (Nennvolumina 150 bis 800 mL)
- ♦ Maßkolben (Nennvolumina 100 bis 250 mL)
- ♦ Kolbenhubpipetten (Nennvolumina 20; 200; 1000 µL, Eppendorf)
- ♦ Messpipetten (Nennvolumina 10 und 20 mL)
- ♦ Spatel
- ♦ Einwegpasteurpipetten (graduiert; Füllvolumen: 3,5 mL)
- ♦ Handschuhe (VWR international, Nitrile bzw. Latex examination gloves)
- ♦ Feinwaage (Sartorius BA 110 S; mit integriertem Abzug)
- ♦ Abzug (Fa. Köttermann)

- ◆ Wasserentsalzungsanlage (Milli-Q plus; Ultra-pure water system, Fa. Millipore, Frankreich)
- ◆ Magnetrührer (mit integrierter Heizplatte: IKAMAG, RCT; ohne Heizplatte, Lösemittel geeignet (T6): IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen, Deutschland)
- ◆ Ultraschallbad (Firma Bandelin, SONOREX, RK 100H)
- ◆ Alufolie (Fa. Roth; Karlsruhe)
- ◆ Oximeter, pH-meter; Leitfähigkeitsmesser (Mehrparameter-Messgerät Multi 340i/SET; Standardleitfähigkeitsmesszelle TetraCon®325; Sauerstoffsensoren Cellox 325; pH-Elektrode SenTix 81; WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten Weilheim, Deutschland)
- ◆ Heizplatte (Minitüb HT 200, Minitüb GmbH Tiefenbach, Deutschland)
- ◆ Binokular (B 061, Olympus, Japan)
- ◆ Blockschälchen (Kristallierschälchen, Mikroskopiernapf; Glas; mit halbrunder Vertiefung; Ø ca. 32mm; ca. 40 x 40 mm)
- ◆ Parafilm M (American National Can, Greenwich, England)
- ◆ Wellplatten aus Polystyren (24 Wells à 3,4 mL Volumen; nunc, Dänemark)
- ◆ selbstklebende Folie (Fasson, S695)
- ◆ Kühlbrutschrank (Heraeus BK 6160, Hanau, Deutschland)
- ◆ Stoppuhr (Fa. hanhart)
- ◆ Inversmikroskop (IMT 2, Olympus, Japan)
- ◆ Fotoapparat (Olympus, SC35, Japan)
- ◆ Filme (FUJIFILM, Superia x-tra, 400er; 36 Bilder, DX F; Schlecker Fotoland, AS Color, 400-36)
- ◆ Gasbrenner (Typ Bunsen, Nennwärmebelastung: 0,95 kW; Fa. SPECCO Erdgas, Deutschland)

3 Ergebnisse & Diskussion der Einzelstoffexperimente

Im folgenden Kapitel sind die an den Embryonen während der 48-stündigen Exposition gegenüber den verschiedenen Einzelstoffen beobachteten letalen und subletalen Effekte für die jeweiligen Substanzenklassen getrennt, in alphabetischer Reihenfolge dargestellt.

Die beobachteten Effekte sowie die daraus berechneten Effekt-Konzentrationen sind in Tabellen zusammengefasst. Es ist jeweils die Anzahl der je Konzentration beobachteten Effekte angegeben (letale Effekte: 2/20 bedeutet, dass zwei von 20 eingesetzten Embryonen koaguliert sind; subletale Effekte: 2/19 bedeutet, dass zwei von 19 nicht-koagulierten Embryonen einen bestimmten Effekt gezeigt haben). Da ein Embryo mehrere subletale Effekte parallel aufweisen kann, kann er daher auch mehrfach aufgeführt sein.

Da die Toxizitätsinformationen der Einzelstoffe den Ausgangspunkt für die Konzentrations-Wirkungs-Analyse der Mischungen bilden, werden diese zuerst vorgestellt (3.1), bevor anschließend die darauf aufbauenden Ergebnisse der Mischungen präsentiert werden (4).

Im Anhang B sind die Daten für die gemessenen Herzschlagfrequenzen der Einzelsubstanzversuche sowie der Mischungen nach 15 Sekunden bzw. 1 Minute in alphabetischer Reihenfolge zusammenfassend dargestellt (Tabellen 1-67). Bei der folgenden Darstellung der Ergebnisse wird nicht explizit darauf verwiesen.

Für die Analgetika wurden zwei verschiedene Ansätze untersucht. In einem ersten Ansatz wurden alle vier letalen Endpunkte als letal gewertet und die $LC_{50}(48h)$ entsprechend berechnet. In einem zweiten Ansatz wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Anschließend wurden auf Basis dieser Untersuchungen Versuche zur Mischungstoxizität durchgeführt. Dabei haben sich Hinweise darauf ergeben, dass die Wahl des Endpunktes einen Einfluss auf das Ergebnis von Mischungsexperimenten haben kann (4.1.1). Daher wurden für die übrigen untersuchten Substanzen ausschließlich die koagulierten Embryonen als letal gewertet, um einen einheitlichen Endpunkt für die folgenden Kombinationsexperimente zu haben und die Varianz zu minimieren.

3.1 Einzelsubstanzexperimente

3.1.1 Analgetika

3.1.1.1 Acetylsalicylsäure (ASS)

In Anlehnung an Bachmann (2002) wurde Acetylsalicylsäure in den Konzentrationen 155,0 µmol/L, 217,0 µmol/L, 303,8 µmol/L, 425,3 µmol/L sowie 595,4 µmol/L untersucht.

Sauerstoff und pH-Wert wurden vor Testbeginn bestimmt. Die Sauerstoffsättigung des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lag in dem für den Test zulässigen Bereich. In den Konzentrationen 425,3 und 595,4 µmol/L lag der pH-Wert unter 5, so dass eine Beeinträchtigung der Embryonen durch den niedrigen pH-Wert nicht ausgeschlossen werden kann. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 3 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden bei maximal 10% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 11% subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab 303,8 µmol/L konzentrations- und zeitabhängig zu. Basierend auf den koagulierten Embryonen wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 345,5 µmol/L ($r^2:1,000$; $b: 17,948$; $LC_{10}: 293,1$ µmol/L) berechnet. Bezieht man alle vier als letal definierten Endpunkte in die Berechnung mit ein (2.3), so ergibt sich eine $LC_{50}(48h)$ von 243,6 µmol/L ($r^2:0,992$; $b: 32,243$; $LC_{10}: 222,3$ µmol/L).

Tabelle 3-1: Zusammenstellung der letalen Effekte von ASS (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	155	217	303,8	425,3	595,4
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	1/20	-
	12	-	-	-	-	1/20	1/19
	24	1/20	-	-	3/20	10/20	17/19
	36	1/20	-	-	4/20	10/20	18/19
	48	1/20	-	-	4/20	19/20	19/19
gesamt [%]	48	5	-	-	20	95	100

Die durch Acetylsalicylsäure verursachten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-2 zusammengestellt. Es zeigten sich in den drei höchsten untersuchten Konzentrationen bereits nach 4, 8 und 12 Stunden Deformationen an der hohen Blastula und den Gastrulationsstadien.

Ab der Konzentration 217 µmol/L war konzentrationsabhängig bei Embryonen der Schwanz nicht vom Dotter abgelöst und es zeigten sich Deformationen an Augen und

Schwanz. Das Herz-Kreislaufsystem und die Pigmentierung waren nach 48 Stunden ebenfalls ab der Konzentration 217 $\mu\text{mol/L}$ beeinträchtigt. Ödeme traten bis in die niedrigste untersuchte Konzentration auf. Ab der Konzentration 303,8 $\mu\text{mol/L}$ hatten Embryonen keine Otolithen in den Sacculi angelegt.

Tabelle 3-2: Zusammenstellung der subletalen Effekte von ASS (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	155	217	303,8	425,3	595,4
deformierte Blastula	4	-	-	-	1/20	8/20	15/19
deformierte Gastrulationsstadien	8	1/20	-	-	8/20	7/19	16/19
	12	1/20	-	-	5/20	7/19	9/18
keine Schwanzablösung	24	-	-	4/20	7/17	10/10	2/2
	36	-	-	1/20	3/16	10/10	1/1
	48	-	-	1/20	4/16	1/1	koa
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	1/1	koa
deformierte Augenanlage	24	-	-	1/20	2/17	2/10	1/2
	36	-	-	1/20	1/16	2/10	-
	48	-	-	1/20	-	-	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	4/20	7/17	10/10	2/2
	36	-	-	1/20	6/16	10/10	1/1
	48	-	-	1/20	8/16	1/1	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	9/16	10/10	1/1
	48	-	-	3/20	16/16	1/1	koa
kein Blutkreislauf	36	11/19	14/20	15/20	16/16	10/10	1/1
	48	-	-	4/20	16/16	1/1	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	8/20	3/16	-	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	5/20	13/16	1/1	koa
Dotterödem	48	-	2/20	3/20	14/16	-	koa
Perikardödem	48	2/19	5/20	5/20	12/16	-	koa
gesamt	48	2/19	6/20	7/20	14/16	-	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	12/16	1/1	koa

Wie Abbildung 3-1 zu entnehmen ist, zeigte sich zudem bereits ab der niedrigsten untersuchten Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Eine Angabe der NOEC ist daher nicht möglich. Die LOEC beträgt 155 $\mu\text{mol/L}$.

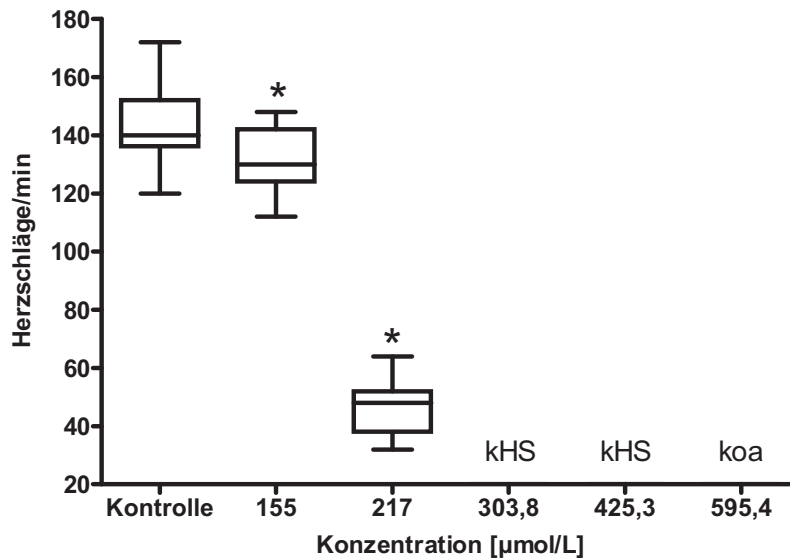


Abbildung 3-1: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der ASS- Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Tabelle 3-3 fasst die berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC zusammen und gibt einen Überblick über die, von Bachmann (2002) ermittelten Werte.

Tabelle 3-3: Darstellung der berechneten Werte des Versuchs mit ASS und Literaturdaten (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten; k.A.: keine Angabe im Text; koa: basierend auf den koagulierten Embryonen; -: keine Angabe möglich).

	Zeit [h]	[µmol/L]	[µmol/L] (Bachmann, 2002)
LC_{50aEP}	48	243,6	k.A.
LC_{50koa}	48	345,5	296
EC_{50} kein Herzschlag	48	236,1	185
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	233,2	185
EC_{50} Pigmentierung	48	205,5	176
EC_{50} Ödeme	48	-	248 (nach 120h)
EC_{50} Schwanzdeformation	48	302,4	322
EC_{50} Schwanzablösung	48	333,8	k.A.
EC_{50} keine Otolithen	48	286,0	k.A.
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-	155 (Schwanzlänge)
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	155,0	216 (Schwanzlänge)

Bachmann (2002) ermittelte in seinen Untersuchungen mit ASS eine $LC_{50}(48h)$ von $296 \mu\text{mol/L}$, die recht gut mit der im vorgestellten Test ermittelten $LC_{50}(48h)$ von $345,5 \mu\text{mol/L}$ übereinstimmt. In beiden Versuchen wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Er beschreibt zudem ähnliche subletale Effekte. Auch in seinen Untersuchungen traten eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems und der Pigmentierung sowie Ödeme auf. Ebenso waren Deformationen zu beobachten. Vergleicht man die Effektkonzentrationen für die Effekte „Herz- Kreislaufsystem“, „Pigmentierung“ und „Ödeme“ der beiden Versuche, so ergeben sich auch hier Übereinstimmungen (Tabelle 3-3).

In der Literatur werden eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben, die bei der Anwendung von Acetylsalicylsäure auftreten können (Bayer, 1999). Mit dem Embryotest konnte von diesen nur die Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufs erfasst werden.

In Studien mit Hunden, Ratten und Mäusen zeigten sich embryo- und fetotoxische Effekte nach oraler Gabe von 3 bis 7 mmol je kg Körpergewicht. Auch konnten im Tierversuch teratogene Effekte an Gliedmaßen, Wirbelsäule und Schädel beobachtet werden (EMEA, 2003). Teratogene Effekte zeigten sich an den exponierten Embryonen im vorgestellten Versuch in Form von Schwanzdeformationen.

3.1.1.2 Diclofenac

3.1.1.2.1 Versuch unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte

Diclofenac wurde für diesen Ansatz nach mehreren Vorversuchen in den Konzentrationen $2,8 \mu\text{mol/L}$, $6,4 \mu\text{mol/L}$, $14,9 \mu\text{mol/L}$, $34,2 \mu\text{mol/L}$ sowie $78,6 \mu\text{mol/L}$ untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 17 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und nur bei maximal 5,3% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die beobachteten letalen Effekte sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Es zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme, wobei nur vereinzelt die Koagulation der Embryonen zu beobachten war. Der Großteil der letalen Effekte wurde durch das Fehlen des Herzschlags hervorgerufen. Anhand dieser Beobachtungen wurde eine $LC_{50}(48h)$ von $9,7 \mu\text{mol/L}$ (r^2 : 0,937; b: 14,058; LC_{10} : $6,7 \mu\text{mol/L}$) berechnet.

Tabelle 3-4: Zusammenstellung der letalen Effekte von Diclofenac. In diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	2,8	6,4	14,9	34,2	78,6
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	2/20	-
	12	-	-	-	-	2/20	-
	24	-	1/20	-	1/20	2/20	-
	36	-	1/20	-	1/20	2/20	-
	48	-	2/20	-	2/20	2/20	-
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
keine Schwanzablösung	24	-	1/20	-	-	-	-
	36	-	1/20	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
kein Herzschlag	36	-	1/20	-	1/20	-	19/19
	48	-	-	1/20	17/20	18/20	19/19
gesamt [%]	48	-	10	5	95	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-5 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich Deformationen an Augen und Kopf, sowie konzentrationsabhängig an Schwanz und Wirbelsäule. Auch konnten bis in die niedrigste untersuchte Konzentration eine Beeinträchtigung des Kreislaufsystems sowie Ödeme beobachtet werden. Effekte auf die Pigmentierung zeigten sich erst ab der höchsten untersuchten Konzentration.

Tabelle 3-5: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Diclofenac. In diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	2,8	6,4	14,9	34,2	78,6
deformierte Augenanlage	24	-	2/19	5/20	-	1/18	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Kopf	24	-	1/19	2/20	-	-	-
	36	-	-	2/20	-	-	-
	48	-	-	1/20	-	-	-
deformierter Schwanz	24	-	2/19	3/20	6/19	18/18	19/19
	36	-	2/19	3/20	19/19	18/18	19/19
	48	-	1/18	19/20	18/18	18/18	19/19
deformierte Wirbelsäule	24	-	1/19	3/20	12/19	18/18	19/19
	36	-	-	3/20	17/19	18/18	19/19
	48	-	-	19/20	18/18	18/18	19/19
kein Blutkreislauf	36	5/19	12/19	16/20	19/19	18/18	19/19
	48	-	4/18	20/20	18/18	18/18	19/19
keine Pigmentierung	48	1/19	-	-	-	1/18	1/19
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	18/19
Dotterödem	48	-	4/18	19/20	18/18	18/18	19/19
Perikardödem	48	-	4/18	15/20	18/18	18/18	19/19
gesamt	48	-	4/18	19/20	18/18	18/18	19/19

Wie Abbildung 3-2 zu entnehmen ist, zeigte sich ab 6,4 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 2,8 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 6,4 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

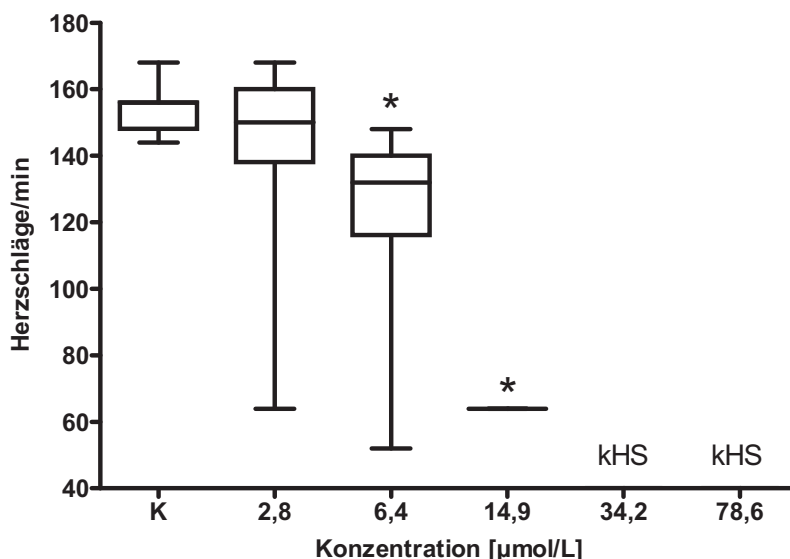


Abbildung 3-2: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-6 zusammengestellt.

Tabelle 3-6: Zusammenfassung der berechneten Werte für Diclofenac. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).

	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50} aEP	48	9,7
EC_{50} kein Herzschlag	48	9,9
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	3,4
EC_{50} Pigmentierung	48	51,8
EC_{50} Ödeme	48	3,6
EC_{50} Schwanzdeformation	48	4,2
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	4,8
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	2,8
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	6,4

3.1.1.2.2 Versuch unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen als letalem Endpunkt

Diclofenac wurde für diesen Ansatz nach mehreren Vorversuchen in den Konzentrationen 78,6 µmol/l, 117,9 µmol/l, 176,8 µmol/L, 265,3 mmol/L sowie 397,9 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 18 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und keine subletalen Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-7 zusammengefasst. Es zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 192,6 µmol/L (r^2 : 0,989, b: 9,995, LC₁₀: 124,8 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-7: Zusammenstellung der letalen Effekte von Diclofenac. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	78,6	117,9	176,8	265,3	397,9
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	3/20
	24	-	-	-	-	13/20	19/20
	36	1/20	-	-	2/20	15/20	20/20
	48	1/20	-	3/20	8/20	19/20	20/20
gesamt [%]	48	5	-	15	40	95	100

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-8 zusammenfassend dargestellt. In den beiden höchsten Konzentrationen zeigten sich Deformationen an den Gastrulationsstadien nach 8 bzw. 12 Stunden. Bis in die niedrigste untersuchte Konzentration traten Deformationen an Schwanz, Wirbelsäule und Somiten auf. Die Schwanzablösung vom Dotter war zudem konzentrationsabhängig beeinträchtigt. Auch konnten ab der Konzentration 117,9 µmol/L Deformationen an Augen und Kopf beobachtet werden. Das Herz-Kreislaufsystem war bis in die niedrigste untersuchte Konzentration beeinträchtigt und es zeigten sich Ödeme. Diese waren jedoch in der Konzentration 265,3 µmol/L bei dem einzigen nicht-koagulierten Embryo nicht zu beobachten. Die Embryonen zeigten zudem bis in die niedrigste untersuchte Konzentration eine reduzierte bzw. fehlende Pigmentierung sowie keine bzw. in Überzahl ausgebildete Otolithen.

Tabelle 3-8: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Diclofenac. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	78,6	117,9	176,8	265,3	397,9
deformierte Gastrula	8	-	-	-	-	3/20	11/20
	12	-	-	-	-	2/20	10/17
keine Schwanzablösung	24	-	-	11/20	17/20	7/7	1/1
	36	-	-	4/20	18/18	5/5	koa
	48	-	4/20	9/17	11/12	1/1	koa
deformierte Somitenanlage	24	-	20/20	20/20	20/20	7/7	1/1
	36	-	20/20	20/20	18/18	5/5	koa
	48	-	20/20	17/17	12/12	1/1	koa
deformierte Augenanlage	24	-	-	11/20	19/20	7/7	1/1
	36	-	-	11/20	18/18	5/5	koa
	48	-	-	12/17	12/12	1/1	koa
deformierter Kopf	24	-	-	4/20	4/20	7/7	1/1
	36	-	-	9/20	18/18	5/5	koa
	48	-	-	10/17	12/12	1/1	koa
deformierter Schwanz	24	-	20/20	20/20	20/20	7/7	1/1
	36	-	20/20	20/20	18/18	5/5	koa
	48	-	20/20	17/17	12/12	1/1	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	20/20	20/20	20/20	7/7	1/1
	36	-	20/20	20/20	18/18	5/5	koa
	48	-	20/20	16/17	12/12	1/1	koa
kein Herzschlag	36	-	19/20	20/20	18/18	5/5	koa
	48	-	20/20	17/17	12/12	1/1	koa
kein Blutkreislauf	36	2/19	20/20	20/20	18/18	5/5	koa
	48	-	20/20	17/17	12/12	1/1	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	11/17	12/12	1/1	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	20/20	6/17	-	-	koa
Dotterödem	48	-	20/20	15/17	5/12	-	koa
Perikardödem	48	-	20/20	8/17	1/12	-	koa
gesamt	48	-	20/20	15/17	5/12	-	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	20/20	17/17	12/12	1/1	koa

Wie Abbildung 3-3 zu entnehmen ist, zeigte bis in die niedrigste untersuchte Konzentration kein Embryo einen Herzschlag. Eine Angabe von NOEC und LOEC ist daher nicht möglich.

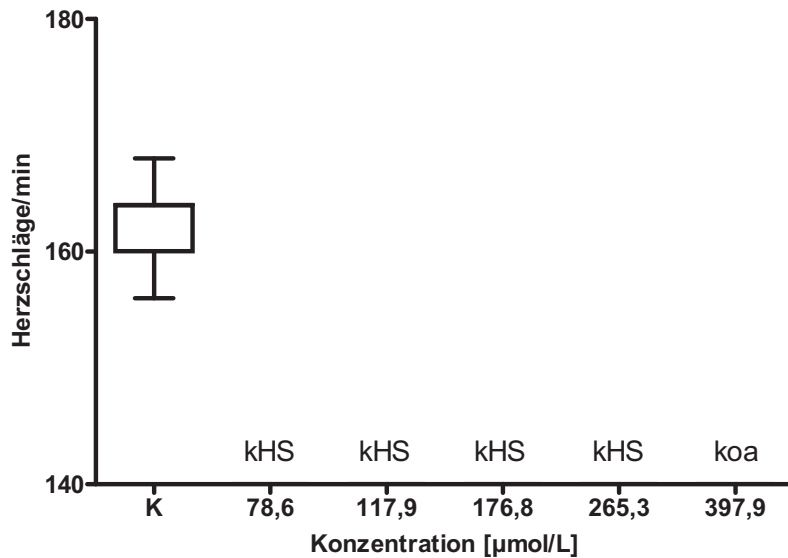


Abbildung 3-3: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-9 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-9: Zusammenfassung der berechneten Werte für Diclofenac. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (aE: alle exponierten Embryonen zeigen diesen Effekt; koa: basierend auf den koagulierten Embryonen; -: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50} koa	48	192,6
EC_{50} Herzschlag	48	aE
EC_{50} Blutkreislauf	48	aE
EC_{50} Pigmentierung	48	aE
EC_{50} Schwanzdeformation	48	aE
EC_{50} Schwanzablösung	48	111,53
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	aE
EC_{50} Somitendeformation	48	aE
EC_{50} Augendeformation	48	107,84
EC_{50} Kopfdeformation	48	113,44
EC_{50} Otolithen	48	aE
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-

In beiden durchgeführten Versuchen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Toxizität von Diclofenac. In dem Versuch basierend auf allen vier letalen Endpunkten wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 9,7 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt, in dem Versuch basierend auf den koagulierten Embryonen eine $LC_{50}(48h)$ von 192,6 $\mu\text{mol/L}$. Die Ursache dafür liegt darin begründet, dass die letalen Effekte im Versuch basierend auf allen vier letalen Endpunkten hauptsächlich durch einen fehlenden Herzschlag hervorgerufen wurden sind, im Versuch basierend auf den koagulierten Embryonen durch die Koagulation der Keime. Die hervorgerufenen subletalen Effekte waren dagegen ähnlich. Durch die höheren Konzentrationen, die im Versuch basierend auf den koagulierten Embryonen eingesetzt wurden, zeigten sich in diesem Versuch auch massivere Effekte als im Versuch basierend auf allen vier letalen Endpunkten (Tabelle 3-5, Tabelle 3-8).

Das Landesumweltamt Brandenburg (2002) gibt eine $LC_{50}(96h)$ von 672,7 $\mu\text{mol/L}$ für den Zebraäbrbling an. Der Embryo hat im Vergleich dazu deutlich sensibler reagiert. Vergleicht man die ermittelten $LC_{50}(48h)$ -Werte zudem mit Daten anderer Organismen aus Untersuchungen von Cleuvers (2003, 2004), so zeigt sich auch dabei, dass der Embryo, abhängig von der Wahl des Endpunktes sensibler als die übrigen Organismen auf Diclofenac reagiert hat (Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10: Darstellung der berechneten $LC_{50}(48h)$ -Werte und Literaturdaten.

Organismus	EC_{50} / LC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]
<i>Lemna minor</i>	23,6
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	226,3
<i>Daphnia magna</i>	213,8
<i>Danio rerio (Test)</i>	9,7 – 196,2

Hallare et al. (2004) untersuchten die Wirkung von Diclofenac auf die Embryonalentwicklung des Zebraäbrblings in einem Konzentrationsbereich bis 6,3 $\mu\text{mol/L}$. In ihren Untersuchungen zeigten sich keine Effekte auf die Entwicklung der Embryonen bis nach 96 Stunden. Auffällig war in den Konzentrationen 3,1 und 6,3 $\mu\text{mol/L}$ ein verzögerter Schlupf, wobei diese spät-geschlüpften Embryonen sich morphologisch nicht von den übrigen Embryonen unterschieden.

Schwaiger et al. (2004) und Hoeger et al. (2005) untersuchten die subletalen Effekte von Diclofenac an adulten *Onchorhynchus mykiss* bzw. *Salmo trutta* in umweltrelevanten Konzentrationen bis 0,2 $\mu\text{mol/L}$. In beiden Studien zeigten sich histopathologische Veränderungen an Nieren und Kiemen. Hoeger et al. (2005) konnten zudem auch einen Effekt auf die Erythrozytenbildung zeigen. Sie schließen aus ihren Ergebnissen auf den selben Wirkmechanismus der Substanz in Fisch und Säuger.

Bei der Anwendung beim Menschen werden eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben (Helvepharm, 2001). Von diesen Effekten zeigten sich beim Embryo eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems sowie Ödeme.

Es zeigte sich zudem im Tierversuch ein teratogenes Potential der Substanz (EMEA, 2004). Bei *in vivo*-Studien mit Mäusen traten Gaumenspalten auf. Auch in den vorgestellten Untersuchungen zeigten sich massive Effekte an Schwanz, Wirbelsäule und Somiten.

3.1.1.3 Ibuprofen

3.1.1.3.1 Versuch unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte

Ibuprofen wurde nach mehreren Vorversuchen in den Konzentrationen 23,7 µmol/L, 47,4 µmol/L, 94,8 µmol/L, 189,5 µmol/L sowie 378,9 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 24 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und nur bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die beobachteten letalen Effekte sind in Tabelle 3-11 zusammengefasst. Es zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 111 µmol/L (r^2 : 0,924; b: 5,752; LC₁₀: 52,2 µmol/L) ermittelt.

Tabelle 3-11: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ibuprofen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	23,7	47,4	94,8	189,5	378,9
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	1/20	8/20
	12	-	-	-	-	1/20	12/20
	24	-	-	-	-	2/20	19/20
	36	-	-	-	-	2/20	19/20
	48	-	2/20	-	1/20	7/20	20/20
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	12/20	1/20
	36	-	-	-	-	12/20	1/20
	48	-	-	-	-	10/20	koa
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	6/20	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	1/20	16/20	-
	48	-	-	2/20	6/20	12/20	koa
gesamt [%]	48	-	10	10	35	95	100

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-12 zusammenfassend dargestellt. In der höchsten untersuchten Konzentration waren nach 8 Stunden fünf Embryonen

(42%) im Stadium der hohen Blastula. Deformationen zeigten sich ab der Konzentration 189,5 µmol/L an Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule. Das Herz-Kreislaufsystem war nach 48 Stunden ab 47,4 µmol/L beeinträchtigt und es traten bereits in der niedrigsten untersuchten Konzentration Ödeme auf. Die Pigmentierung war ab 94,8 µmol/L reduziert oder fehlte. Alle Embryonen in 189,5 µmol/L hatten keine Otolithen ausgebildet.

Tabelle 3-12: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ibuprofen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	23,7	47,4	94,8	189,5	378,9
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	-	5/12
	12	-	-	-	-	-	-
deformierte Augenanlage	24	-	1/20	-	-	12/18	1/1
	36	-	-	-	-	12/18	koa
	48	-	-	-	-	8/13	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	1/18	1/1
	36	-	-	-	-	1/18	koa
	48	-	-	-	-	2/13	koa
deformierter Schwanz	24	-	1/20	-	-	15/18	1/1
	36	-	-	-	-	15/18	koa
	48	-	-	-	1/19	13/13	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	1/20	-	-	3/18	1/1
	36	-	-	-	-	3/18	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
kein Blutkreislauf	36	6/20	12/20	16/20	20/20	18/18	1/1
	48	-	-	2/20	19/19	13/13	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	-	1/19	8/13	koa
reduzierte Pigmentierung	48	1/20	-	-	-	5/13	koa
Dotterödem	48	-	1/18	2/20	19/19	7/13	koa
Perikardödem	48	-	-	1/20	17/19	7/13	koa
gesamt	48	-	1/18	2/20	19/19	7/13	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	-	13/13	koa

Wie Abbildung 3-4 zu entnehmen ist, zeigte sich ab 47,4 µmol/L eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Anhand der Daten wurden mittels Dunetts-Test eine NOEC von 23,7 µmol/L sowie eine LOEC von 47,4µmol/L ermittelt.

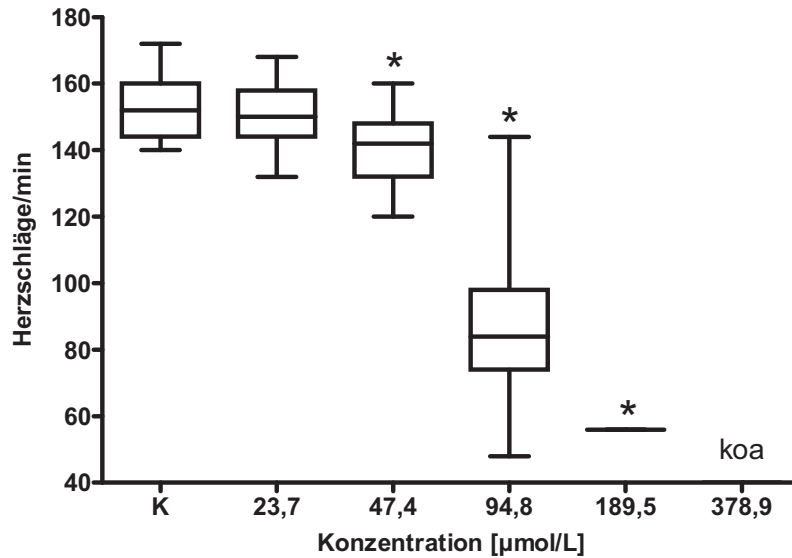


Abbildung 3-4: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Ibuprofen-Konzentration. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-13 zusammengestellt.

Tabelle 3-13: Zusammenfassung der berechneten Werte für Ibuprofen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50} aEP	48	111,0
EC_{50} Herzschlag	48	111,7
EC_{50} Blutkreislauf	48	64,4
EC_{50} Pigmentierung	48	134,0
EC_{50} Schwanzdeformation	48	120,2
EC_{50} Augendeformation	48	230,4
EC_{50} Kopfdeformation	48	241,2
EC_{50} Otolithen	48	115,7
NOEC (Herzschlag)	48	23,7
LOEC (Herzschlag)	48	47,4

3.1.1.3.2 Versuch nur unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen als letalem Endpunkt

Ibuprofen wurde nach mehreren Vorversuchen in den Konzentrationen 35,6 µmol/L, 71,1 µmol/L, 142,2 µmol/L, 284,4 µmol/L sowie 568,8 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 25 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und keine subletalen Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-14 zusammengefasst. Es zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Bereits nach 24 Stunden waren in der höchsten untersuchten Konzentration alle eingesetzten Embryonen koaguliert. Anhand der beobachteten letalen Effekte wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 200,5 µmol/L (r^2 : 0,981, b : 43,159, LC_{10} : 127,1 µmol/L) ermittelt.

Tabelle 3-14: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ibuprofen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	35,6	71,1	142,2	284,4	568,8
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	19/20
	12	1/20	-	-	1/20	2/20	20/20
	24	1/20	-	-	2/20	16/20	20/20
	36	1/20	1/21	-	3/20	16/20	20/20
	48	1/20	1/21	2/20	4/20	17/20	20/20
gesamt [%]	48	5	5	10	20	85	100

Die während der 48-stündigen Exposition gegenüber Ibuprofen beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-15 zusammenfassend dargestellt. In den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen waren nach 8 Stunden 10% bzw. 100% der exponierten Embryonen noch im Stadium der hohen Blastula. Es zeigten sich während der 48-stündigen Exposition zudem Effekte auf Schwanzablösung und Somitenanlage, auch waren Deformationen an Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule zu beobachten. Die Entwicklung des Herzkreislaufsystems und der Pigmentierung waren ab 71,1 µmol/L beeinträchtigt, Ödeme traten bis in die niedrigste untersuchte Konzentration auf. Ab der Konzentration 142,2 µmol/L hatten Embryonen keine Otolithen oder diese in Überzahl ausgebildet.

Tabelle 3-15: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ibuprofen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert, -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	35,6	71,1	142,2	284,4	568,8
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	2/20	1/1
	12	-	-	-	-	-	koa
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	4/18	4/4	koa
	36	-	-	-	-	4/4	koa
	48	-	-	-	3/16	3/3	koa
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	3/4	koa
	36	-	-	-	-	4/4	koa
	48	-	-	-	-	3/3	koa
deformierte Augenanlage	24	-	-	-	1/18	4/4	koa
	36	-	-	-	1/17	4/4	koa
	48	-	-	-	2/16	3/3	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	2/18	4/4	koa
	36	-	-	-	1/17	4/4	koa
	48	-	-	-	-	3/3	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	-	7/18	4/4	koa
	36	-	-	1/20	5/17	4/4	koa
	48	-	-	2/18	11/16	3/3	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	7/18	4/4	koa
	36	-	-	-	5/17	4/4	koa
	48	-	-	1/18	10/16	3/3	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	2/17	4/4	koa
	48	-	-	-	9/16	3/3	koa
kein Blutkreislauf	36	2/19	10/20	18/20	17/17	4/4	koa
	48	-	-	12/18	16/16	3/3	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	-	4/16	3/3	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	1/18	12/16	-	koa
Dotterödem	48	-	1/20	12/18	14/16	-	koa
Perikardödem	48	-	-	7/18	8/16	-	koa
gesamt	48	-	1/20	12/18	14/16	-	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	6/16	3/3	koa

Wie Abbildung 3-5 zu entnehmen ist, zeigte sich ab 71,1 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 35,6 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 71,1 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

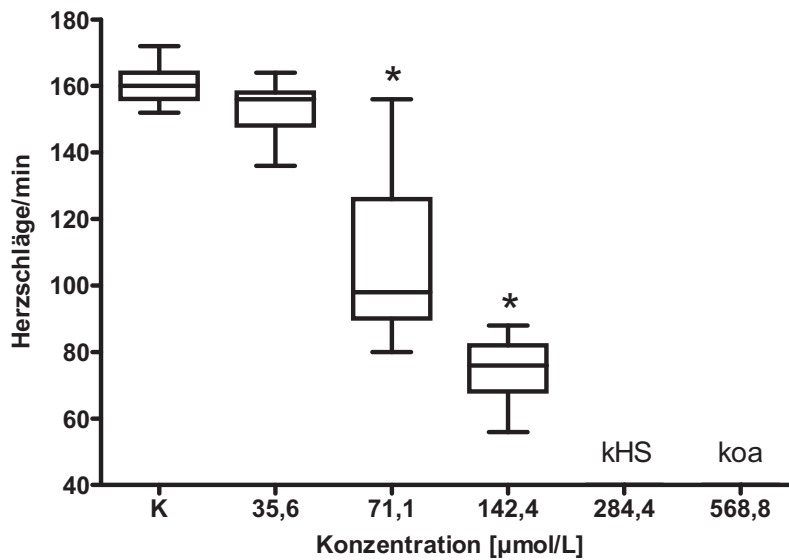


Abbildung 3-5: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Ibuprofen-Konzentration. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-16 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-16: Zusammenfassung der berechneten Werte für Ibuprofen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50} koa	48	200,5
EC_{50} kein Herzschlag	48	137,4
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	62,8
EC_{50} Ödeme	48	62,7
EC_{50} Pigmentierung	48	90,0
EC_{50} Schwanzdeformation	48	116,6
EC_{50} Schwanzablösung	48	166,0
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	126,7
EC_{50} Augendeformation	48	234,8
EC_{50} Kopfdeformation	48	201,1
EC_{50} Otolithen	48	151,8
NOEC (Herzschlag)	48	35,6
LOEC (Herzschlag)	48	71,1

In den beiden durchgeführten Versuchen war die Toxizität von Ibuprofen im Versuch basierend auf allen vier letalen Endpunkten größer (LC₅₀(48h): 111 µmol/L) als in dem Versuch, in dem nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet wurden (LC₅₀(48h): 200,5 µmol/L). Die Ursache dafür liegt in der Wahl des Endpunktes. Während im Versuch basierend auf allen vier letalen Endpunkten sowohl fehlender Herzschlag als auch die Koagulation der Embryonen zu den letalen Effekten beigetragen haben, wurden im anderen Versuch nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet, so dass höhere Konzentrationen eingesetzt werden mussten, um eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ermitteln zu können. Es traten jedoch ähnlich subletale Effekte auf.

Das Landesumweltamt Brandenburg (2002) gibt eine LC₅₀(96h) von 757 µmol/L für *Lepomis macrochirus* an. Der Embryo hat im Vergleich dazu deutlich sensitiver reagiert. Vergleicht man die ermittelten LC₅₀(48h)-Werte mit Daten anderer Organismen aus Untersuchungen von Cleuvers (2003, 2004), so hat der Embryo weniger sensitiv als *Lemna minor*, jedoch sensitiver als *Daphnia magna* und *Desmodesmus subspicatus* reagiert (Tabelle 3-17).

Tabelle 3-17: Darstellung der berechneten LC₅₀(48h)-Werte und Literaturdaten.

Organismus	LC ₅₀ /EC ₅₀ [µmol/L]
<i>Lemna minor</i>	96,4
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	1379,8 – 1498,9
<i>Daphnia magna</i>	443,3 - 473,1
<i>Danio rerio (Test)</i>	111 – 200,5

In der Packungsbeilage werden für die Anwendung von Ibuprofen beim Menschen eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben (Helvepharm, 2004). Als einziger dieser Effekte konnte beim Embryo die Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufs beobachtet werden.

3.1.1.4 Naproxen

3.1.1.4.1 Versuch unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte

Naproxen wurde nach mehreren Vorversuchen in den Konzentrationen 40,3 µmol/l, 80,6 µmol/L, 161,1 µmol/L, 322,2µmol/L sowie 644,3 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 29 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen weder letale noch subletale Effekte zu beobachten waren.

Die beobachteten letalen Effekte sind in Tabelle 3-18 zusammengefasst. Ab 161,1 $\mu\text{mol/L}$ zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 254,5 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 0,976; b: 5,248; LC_{10} : 145,1 $\mu\text{mol/L}$) berechnet.

Tabelle 3-18: Zusammenstellung der letalen Effekte von Naproxen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	40,3	80,6	161,1	322,2	644,3
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	4/20
	12	-	-	-	-	1/20	15/20
	24	-	-	-	2/20	11/20	20/20
	36	-	-	-	2/20	11/20	20/20
	48	-	1/18	-	2/20	11/20	20/20
keine Somitenanlage	24	-	1/18	-	-	-	koa
	36	-	1/18	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
keine Schwanzablösung	24	-	1/18	-	-	-	koa
	36	-	1/18	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
kein Herzschlag	36	-	1/18	-	-	-	koa
	48	-	-	-	1/20	3/20	koa
gesamt [%]	48	-	5,7	-	15	70	100

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-19 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich während der 48-stündigen Exposition vereinzelt Deformationen an Augen, Schwanz und Wirbelsäule (max. 11 %). Eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems sowie Ödeme waren nach 48 Stunden konzentrationsabhängig ab 80,6 $\mu\text{mol/L}$ zu beobachten. Effekte auf die Pigmentierung traten nur vereinzelt auf (max. 5%).

Tabelle 3-19: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Naproxen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	40,3	80,6	161,1	322,2	644,3
deformierte Augenanlage	24	-	1/20	-	-	-	koa
	36	-	1/20	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
deformierter Schwanz	24	-	1/20	1/20	-	1/9	koa
	36	-	1/20	1/20	-	1/9	koa
	48	-	-	1/20	1/18	1/9	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	1/9	koa
	36	-	-	-	-	1/9	koa
	48	-	-	-	-	1/9	koa
kein Blutkreislauf	36	4/16	9/20	15/20	17/18	9/9	koa
	48	-	-	4/20	16/18	9/9	koa
keine Pigmentierung	48	-	1/19	-	-	-	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	1/20	-	-	koa
Dotterödem	48	-	-	3/20	8/18	7/9	koa
Perikardödem	48	-	-	2/20	13/18	8/9	koa
gesamt	48	-	-	3/20	13/18	9/9	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	-	1/9	koa

Wie Abbildung 3-6 zu entnehmen ist, zeigte sich ab einer Konzentration von 161,1 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden anhand der Daten eine NOEC von 80,6 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 161,1 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

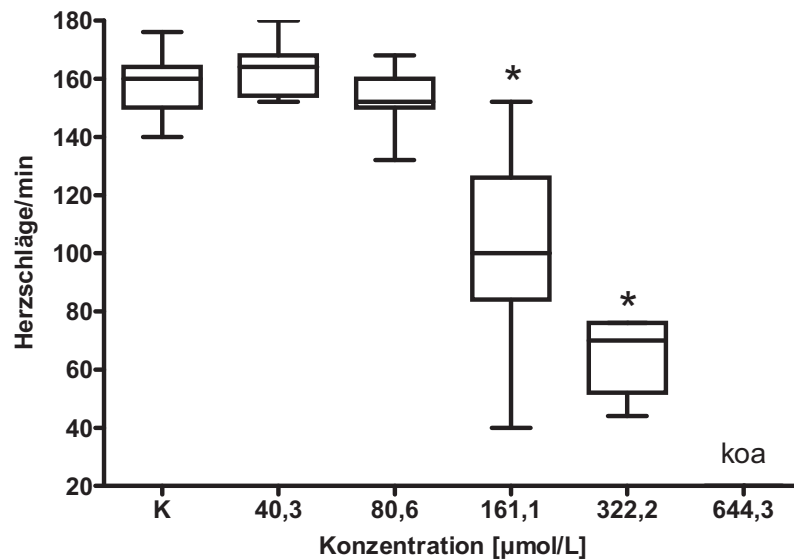


Abbildung 3-6: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Naproxen-Konzentration. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-20 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-20: Zusammenfassung der berechneten Werte für Naproxen beim Versuch unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50aEP}	48	254,5
EC_{50} kein Herzschlag	48	356,0
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	106,9
EC_{50} Ödeme	48	125,2
NOEC (Herzschlag)	48	80,6
LOEC (Herzschlag)	48	161,1

3.1.1.4.2 Versuch nur unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen als letalem Endpunkt

Naproxen wurde nach mehreren Vorversuchen in den Konzentrationen 107,4 µmol/L, 161,1 µmol/L, 241,6 µmol/L, 362,4 µmol/L sowie 543,7 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 30 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 10% subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-21 zusammengefasst. Ab der Konzentration 161,1 µmol/L zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 237,1 µmol/L (r^2 : 0,984; b : 10,646; LC_{10} : 179,8 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-21: Zusammenstellung der letalen Effekte von Naproxen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	107,4	161,1	241,6	362,4	543,7
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	1/20	-	-	-	1/20	3/20
	12	1/20	-	-	-	1/20	13/20
	24	1/20	-	2/20	8/20	20/20	20/20
	36	1/20	-	2/20	10/20	20/20	20/20
	48	1/20	-	2/20	11/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	5	-	10	55	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-22 zusammenfassend dargestellt. Effekte auf die Schwanzablösung sowie Deformationen an Somiten, Augen und Kopf wurden v.a. in 241,6 µmol/L beobachtet. Schwanz- und Wirbelsäulendeformationen traten, ebenso wie Ödeme, ab der niedrigsten untersuchten Konzentration konzentrationsabhängig auf. Auch die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems, der Pigmentierung und der Otolithen waren ab der niedrigsten untersuchten Konzentration beeinträchtigt.

Tabelle 3-22: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Naproxen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	107,4	161,1	241,6	362,4	543,7
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	1/19	-
keine Schwanzablösung	24	-	1/20	1/18	7/12	koa	koa
	36	-	-	-	4/10	koa	koa
	48	-	-	-	2/9	koa	koa
deformierte Somitenanlage	24	-	-	-	1/12	koa	koa
	36	-	-	-	1/10	koa	koa
	48	-	-	-	-	koa	koa
deformierte Augenanlage	24	-	1/20	-	6/12	koa	koa
	36	-	-	-	3/10	koa	koa
	48	-	-	-	3/9	koa	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	3/12	koa	koa
	36	-	-	-	3/10	koa	koa
	48	-	-	-	2/9	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	1/20	1/18	11/12	koa	koa
	36	-	1/20	11/18	10/10	koa	koa
	48	-	1/20	11/18	8/9	koa	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	1/18	7/12	koa	koa
	36	-	-	4/18	9/10	koa	koa
	48	-	1/20	2/18	8/9	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	1/20	-	6/10	koa	koa
	48	-	-	1/18	3/9	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	3/19	14/20	16/18	10/10	koa	koa
	48	1/19	4/20	10/18	9/9	koa	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	3/18	4/9	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	3/20	2/18	3/9	koa	koa
Dotterödem	48	2/19	3/20	9/18	5/9	koa	koa
Perikardödem	48	1/19	2/20	11/18	7/9	koa	koa
gesamt	48	2/19	3/20	13/18	7/9	koa	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	1/20	1/18	4/9	koa	koa

Wie Abbildung 3-7 zu entnehmen ist, zeigte sich ab einer Konzentration von 161,1 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunnetts-Test wurden eine NOEC von 107,4 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 161,1 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

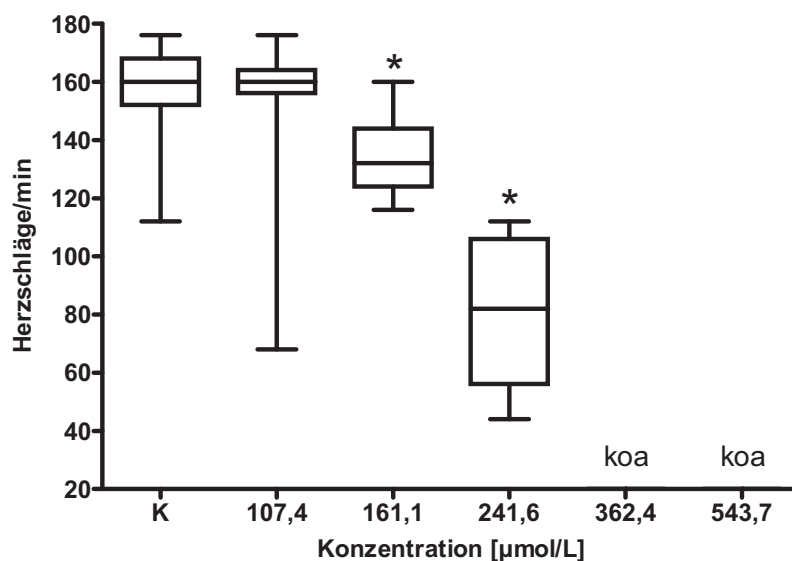


Abbildung 3-7: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Naproxen-Konzentration. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-23 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-23: Zusammenfassung der berechneten Werte für Naproxen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen).

Effekt	Zeit [h]	$EC_{50}(48h)$; [$\mu\text{mol/L}$]
LC_{50} koa	48	237,1
EC_{50} kein Herzschlag	48	260,4
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	152,2
EC_{50} Schwanzdeformation	48	152,8
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	197,3
EC_{50} Augendeformation	48	254,0
EC_{50} Kopfdeformation	48	261,9
EC_{50} Pigmentierung	48	188,3
EC_{50} Ödeme	48	153,3
EC_{50} Otolithen	48	246,2
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	107,4
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	161,1

Die Toxizität von Naproxen war in den beiden durchgeführten Versuchen mit LC₅₀(48h)-Werten von 254,5 µmol/L, im Versuch basierend auf allen vier letalen Endpunkten bzw. von 237,1 µmol/L, im Versuch basierend auf den koagulierten Embryonen, vergleichbar. In beiden Tests dominierte die Koagulation der Embryonen. Es zeigten sich zudem ähnliche subletale Effekte.

Das Landesumweltamt Brandenburg (2002) gibt für Naproxen eine LC₅₀(96h) von 2220,1 µmol/L für *Lepomis macrochirus* und von 2735,5 µmol/L für *Onchorhynchus mykiss* an. Der Embryo hat damit deutlich sensibler reagiert. Vergleicht man die ermittelten LC₅₀(48h)-Werte zudem mit Daten anderer Organismen aus Untersuchungen von Cleuvers (2003, 2004), so hat der Embryo weniger sensitiv als *Lemna minor*, jedoch sensitiver als *Desmodesmus subspicatus* und *Daphnia magna* reagiert (Tabelle 3-24).

Tabelle 3-24: Darstellung der berechneten LC₅₀(48h) und Literaturdaten.

Organismus	EC ₅₀ / LC ₅₀ [µmol/L]
<i>Lemna minor</i>	95,9
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	1268,6 – 2479,8
<i>Daphnia magna</i>	659,3 – 689,8
<i>Danio rerio (Test)</i>	237,1 – 254,5

In der Packungsbeilage werden für die Anwendung von Naproxen beim Menschen eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben (Mepha Pharma, 1997). Beim Embryo konnten davon eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems sowie Ödeme erfasst werden.

3.1.1.5 Paracetamol

3.1.1.5.1 Versuch unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte

Paracetamol wurde nach mehreren Vorversuchen in den Konzentrationen 475,1 µmol/l, 1092,6 µmol/l, 2513,2 µmol/L, 5780,4 µmol/L sowie 13295,0 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 33 zusammengestellt. Eine Bestimmung des pH-Wertes der einzelnen Lösungen konnte aufgrund eines Defekts der Sonde nicht durchgeführt werden.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 10% subletale Effekte zu beobachten waren.

Die beobachteten letalen Effekte sind in Tabelle 3-25 zusammengefasst. Es konnte eine LC₅₀(48h) von 8021,6 µmol/L (r^2 : 0,936; b: 9,616; LC₁₀: 4739,8 µmol/L) ermittelt werden.

Tabelle 3-25: Zusammenstellung der letalen Effekte von Paracetamol. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	475,1	1092,6	2513,2	5780,4	13295,0
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	3/20
	24	-	1/20	1/20	-	-	7/20
	36	1/20	1/20	1/20	-	-	8/20
	48	1/20	2/20	1/20	-	1/20	13/20
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	3/20
	36	-	-	-	-	-	2/20
	48	-	-	-	-	-	-
keine Schwanzablösung	24	-	-	1/20	-	1/20-	7/20
	36	-	-	-	-	1/20	6/20
	48	-	-	-	-	-	-
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	1/20	11/20
	48	-	1/20	1/20	-	3/20	7/20
gesamt [%]	48	5	15	10	-	20	100

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-26 zusammenfassend dargestellt. In der höchsten untersuchten Konzentration zeigte sich nach 8 und 12 Stunden bei 35% bzw. 6% der eingesetzten Embryonen ein verzögerter Gastrulationsbeginn. Deformationen waren an Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule zu beobachten, wobei deutliche Effekte (> 10%) erst in den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen auftraten. Auch eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems und Ödeme zeigten sich nach 48 Stunden bei mehr als 11% der Keime erst in den beiden höchsten Konzentrationen, ebenso Effekte auf die Ausbildung der Otolithen. Die Entwicklung der Pigmentierung war dagegen bis in die niedrigste untersuchte Konzentration beeinträchtigt.

Tabelle 3-26: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Paracetamol. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	475,1	1092,6	2513,2	5780,4	13295,0
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	-	7/20
	12	-	-	-	-	-	1/17
deformierte Augenanlage	24	-	-	3/19	-	4/20	12/13
	36	-	-	-	-	1/20	10/12
	48	-	-	-	-	-	7/7
deformierter Kopf	24	-	-	1/19	-	-	3/13
	36	-	1/19	-	-	-	2/12
	48	-	-	-	-	9/20	7/7
deformierter Schwanz	24	-	-	3/19	-	4/20	13/13
	36	-	-	-	-	18/20	12/12
	48	-	-	-	-	16/20	7/7
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	3/13
	36	-	-	-	-	-	2/12
	48	-	-	-	-	10/19	7/7
kein Blutkreislauf	36	6/19	8/19	10/19	4/20	20/20	12/12
	48	-	2/18	1/19	-	19/19	7/7
keine Pigmentierung	48	2/19	-	-	4/20	14/19	6/7
reduzierte Pigmentierung	48	-	1/18	3/19	15/20	5/19	1/7
Dotterödem	48	-	-	-	-	16/19	6/7
Perikardödem	48	-	2/18	-	-	17/19	7/7
gesamt	48	-	2/18	-	-	17/19	7/7
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	-	5/19	6/7

Wie Abbildung 3-8 zu entnehmen ist, zeigte sich ab einer Konzentration von 5780,4 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Es konnten anhand dieser Daten mittels Dunetts-Test eine NOEC von 2513,2 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 5780,4 $\mu\text{mol/L}$ bestimmt werden.

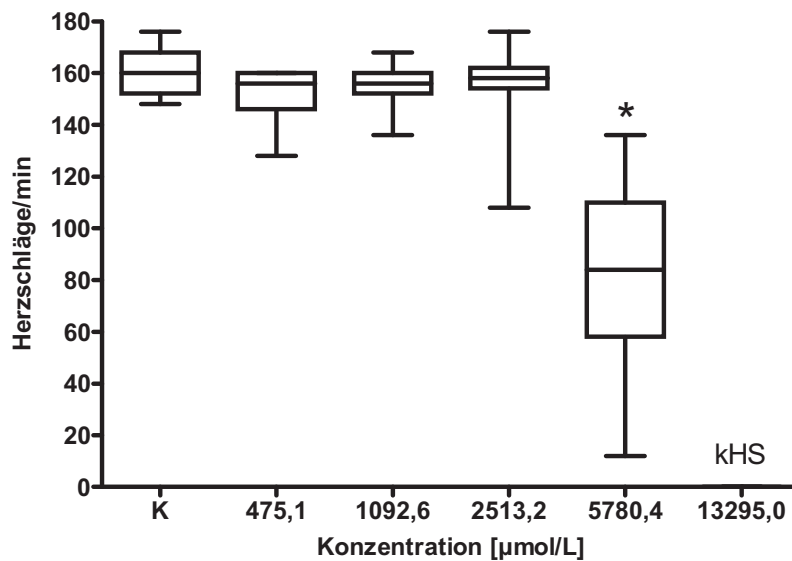


Abbildung 3-8: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-27 zusammengestellt.

Tabelle 3-27: Zusammenfassung der berechneten Werte für Paracetamol. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).

	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50} aEP	48	8021,6
EC_{50} kein Herzschlag	48	7774,8
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	3878,6
EC_{50} Ödeme	48	4545,4
EC_{50} Pigmentierung	48	1650,7
EC_{50} Schwanzdeformation	48	4713,5
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	5680,3
EC_{50} Augendeformation	48	8766,4
EC_{50} Kopfdeformation	48	5915,1
EC_{50} Otolithen	48	7888,8
NOEC	48	2513,2
LOEC	48	5780,4

3.1.1.5.2 Versuch nur unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen als letalem Endpunkt

Paracetamol wurde nach mehreren Vorversuchen in den Konzentrationen 2513,2 µmol/L, 5026,5 µmol/L, 10052,9 µmol/L, 20105,8 µmol/L sowie 40211,6 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 34 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und nur bei maximal 5,6% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-28 zusammengefasst. Ab der Konzentration 10052,9 µmol/L zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es konnte eine $LC_{50}(48h)$ von 12071,6 µmol/L (r^2 : 0,960; b: 4,232; LC_{10} : 6015,3 µmol/L) ermittelt werden.

Tabelle 3-28: Zusammenstellung der letalen Effekte von Paracetamol. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	2513,2	5026,5	10052,9	20105,8	4211,6
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	3/20	7/20	15/23
	24	-	-	-	6/20	14/20	23/23
	36	-	-	-	6/20	14/20	23/23
	48	-	-	-	8/20	16/20	23/23
gesamt [%]	48	-	-	-	40	80	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-29 zusammenfassend dargestellt. In den drei höchsten untersuchten Konzentrationen zeigten nach 8 und 12 Stunden Embryonen eine verzögerte Entwicklung. Während der 48-stündigen Exposition waren zudem Effekte auf die Schwanzablösung und Deformationen an Augen, Somiten, Kopf sowie Schwanz und Wirbelsäule zu beobachten. Die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und der Pigmentierung waren bis in die niedrigste untersuchte Konzentration beeinträchtigt, auch traten bis in die niedrigste untersuchte Konzentration Ödeme auf. Effekte auf die Entwicklung der Otolithen waren in den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen zu beobachten.

Tabelle 3-29: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Paracetamol. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	2513,2	5026,5	10052,9	20105,8	40211,6
keine Gastrulation	8	-	-	-	1/20	8/20	15/23
	12	-	-	-	-	1/13	7/8
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	2/14	4/6	koa
	36	-	-	-	2/14	4/6	koa
	48	-	-	-	-	3/4	koa
deformierte Somitenanlage	24	-	-	-	3/14	4/6	koa
	36	-	-	-	-	4/6	koa
	48	-	-	-	-	3/4	koa
deformierte Augenanlage	24	-	-	4/19	13/14	6/6	koa
	36	-	-	-	13/14	6/6	koa
	48	-	-	-	11/12	4/4	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	3/14	5/6	koa
	36	-	-	-	2/14	5/6	koa
	48	-	-	-	9/12	4/4	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	3/19	11/14	6/6	koa
	36	-	-	3/19	14/14	6/6	koa
	48	-	-	14/19	12/12	4/4	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	1/14	2/6	koa
	36	-	-	-	1/14	4/6	koa
	48	-	-	7/19	12/12	4/4	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	14/14	6/6	koa
	48	-	-	-	12/12	4/4	koa
kein Blutkreislauf	36	6/18	14/20	19/19	14/14	6/6	koa
	48	1/18	2/20	19/19	12/12	4/4	koa
keine Pigmentierung	48	-	20/20	19/19	12/12	4/4	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	koa
Dotterödem	48	1/18	2/20	19/19	11/12	-	koa
Perikardödem	48	1/18	1/20	19/19	12/12	-	koa
gesamt	48	1/18	2/20	19/19	12/12	-	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	8/12	4/4	koa

Wie Abbildung 3-9 zu entnehmen ist, zeigte sich ab einer Konzentration von 5026,5 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 2513,2 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 5026,5 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

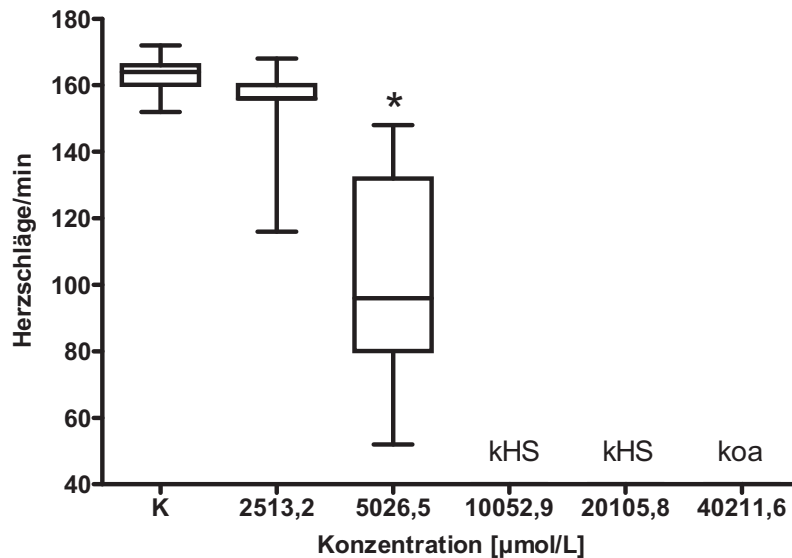


Abbildung 3-9: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-30 zusammengestellt.

Tabelle 3-30: Zusammenfassung der berechneten Werte für Paracetamol. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen).

	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50} koa	48	12071,6
EC_{50} kein Herzschlag	48	7108,5
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	3207,7
EC_{50} Ödeme	48	3207,7
EC_{50} Schwanzablösung	48	17756,7
EC_{50} Somitendeformation	48	17756,7
EC_{50} Schwanzdeformation	48	4224,9
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	5383,9
EC_{50} Augendeformation	48	8111,9
EC_{50} Kopfdeformation	48	8878,4
EC_{50} Otolithen	48	9231,2
NOEC	48	2513,2
LOEC	48	5026,5

Die Toxizität von Paracetamol war mit einer $LC_{50}(48h)$ von 8021,6 $\mu\text{mol/L}$ im Versuch basierend auf allen vier letalen Endpunkten größer als im Versuch basierend auf den koagulierten Embryonen ($LC_{50}(48h)$: 12071,6 $\mu\text{mol/L}$). Es traten jedoch ähnliche subletale Effekte auf.

Vergleicht man die berechneten $LC_{50}(48h)$ -Werte mit Angaben für andere Organismen, so zeigt sich, dass der Embryo in den vorgestellten Untersuchungen deutlich unsensitiver reagiert hat (Tabelle 3-31).

Tabelle 3-31: Darstellung der berechneten $LC_{50}(48h)$ und Literaturdaten (aus: Landesumweltamts Brandenburg (2002)).

Organismus	EC_{50}/LC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]
Alge	886,2
<i>Daphnia magna</i>	330,7
<i>Danio rerio</i> (Embryo)	2500
<i>Danio rerio</i> (Test)	8021,6 – 12071,6

Auch für Paracetamol werden für die Anwendung beim Mensch in der Packungsbeilage eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben (Viatrix GmbH, 2003). Beim Embryo konnte von diesen Effekten eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Blutkreislaufs erfasst werden.

3.1.1.6 Analgetika- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden die fünf Stoffe Acetylsalicylsäure (ASS), Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol als Einzelstoffe untersucht. Mit Ausnahme von ASS wurden zwei Versuche durchgeführt, um die $LC_{50}(48h)$ einmal unter Berücksichtigung aller vier letaler Endpunkte und einmal nur unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen berechnen zu können.

Vergleicht man die erhaltenen LC_{50} -Werte nach 48 Stunden, so zeigt sich, dass Diclofenac in beiden Versuchen am toxischsten war, Paracetamol am ungiftigsten (Tabelle 3-32).

Tabelle 3-32: Darstellung der berechneten $LC_{50}(48h)$ -Werte der einzelnen Analgetika sowie der „Spacing“-Faktoren zwischen den Werten aus beiden Versuchen (aEP: Versuch in dem alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt wurden; koa: Versuch in dem ausschließlich die koagulierten Embryonen als letal gewertet wurden).

	$LC_{50}(48h)$, [$\mu\text{mol/L}$]				
	ASS	Diclofenac	Ibuprofen	Naproxen	Paracetamol
aEP	243,6	9,7	111	254,5	8021,6
koa	345,5	192,6	200,5	237,1	12071,6
Faktor	1,4	19,9	1,8	1,1	1,5

Im Versuch basierend auf allen vier letalen Endpunkten zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Diclofenac bzw. Paracetamol und den Werten für die übrigen drei Substanzen. Im Versuch basierend auf den koagulierten Embryonen sind die Werte für Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen dagegen vergleichbar, nur Paracetamol ist deutlich weniger toxisch.

Die Unterschiede in den LC₅₀-Werten nahmen in der Reihenfolge Naproxen > ASS > Paracetamol > Ibuprofen > Diclofenac zu. Die Unterschiede lassen sich durch das unterschiedliche Auftreten von letalen Effekten in den Versuchen, in denen alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt wurden, erklären. Bei Naproxen zeigte sich auch in diesem Versuch v.a. die Koagulation der Embryonen. Bei ASS, Ibuprofen und Paracetamol traten konzentrationsabhängig v.a. fehlender Herzschlag und die Koagulation der Embryonen auf. Bei Diclofenac war v.a. der fehlende Herzschlag zu beobachten (vgl. Tabelle 3-1, Tabelle 3-4, Tabelle 3-11, Tabelle 3-18, Tabelle 3-25).

Auch Fent et al. (2006) ordnen Diclofenac als die Substanz mit der höchsten akuten Toxizität unter den NSAID ein. Diese These wird auch durch einen Vergleich der EC₅₀-Werte für andere Organismen aus der Literatur bestätigt (Tabelle 3-33).

Tabelle 3-33: Dargestellt sind die EC₅₀-Werte in µmol/L für die fünf untersuchten Substanzen in unterschiedlichen Testsystemen (ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; E: Embryo; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; -: keine Angabe).

Organismus	Substanz				
	ASS	Dic	Ibu	Nap	Para
<i>Lemna minor</i>	-	23,6	96,4	95,9	-
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	592,3	226,0	1498,9	2479,8	886,2
<i>Daphnia magna</i>	489,0	213,8	443,1	659,3	330,7

Es zeigten sich für alle fünf Substanzen vergleichbare subletale Effekte. Auffällig war jedoch das massive Auftreten von Deformationen während der Exposition der Embryonen gegenüber Diclofenac in beiden Versuchen (Abbildung 3-10; Abbildung 3-11).

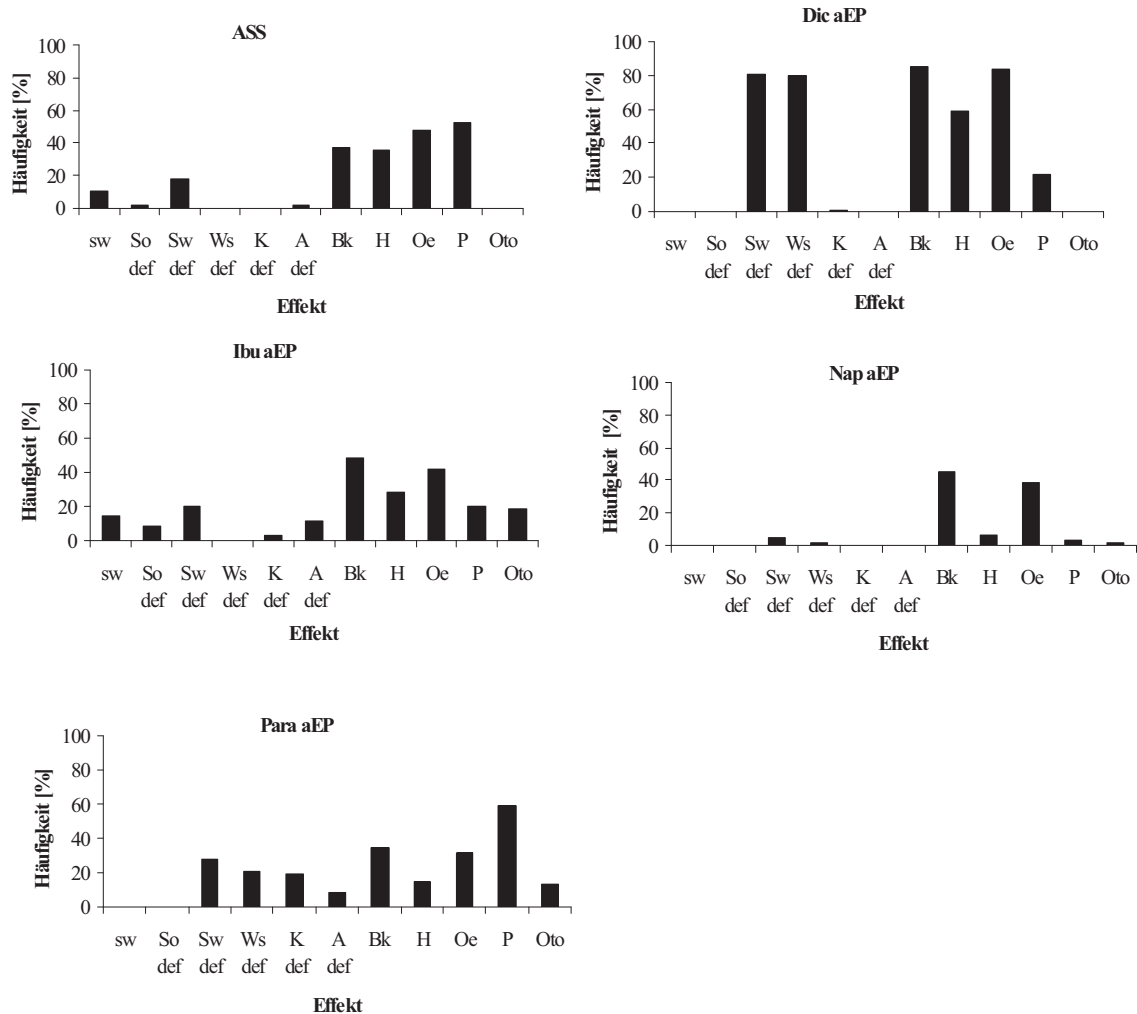


Abbildung 3-10: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den fünf Einzelstoffen der Gruppe der Analgetika unter Berücksichtigung aller vier letaler Endpunkte: a) Acetylsalicylsäure b) Diclofenac; c) Ibuprofen; d) Naproxen; e) Paracetamol (ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; aEP: alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt; sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

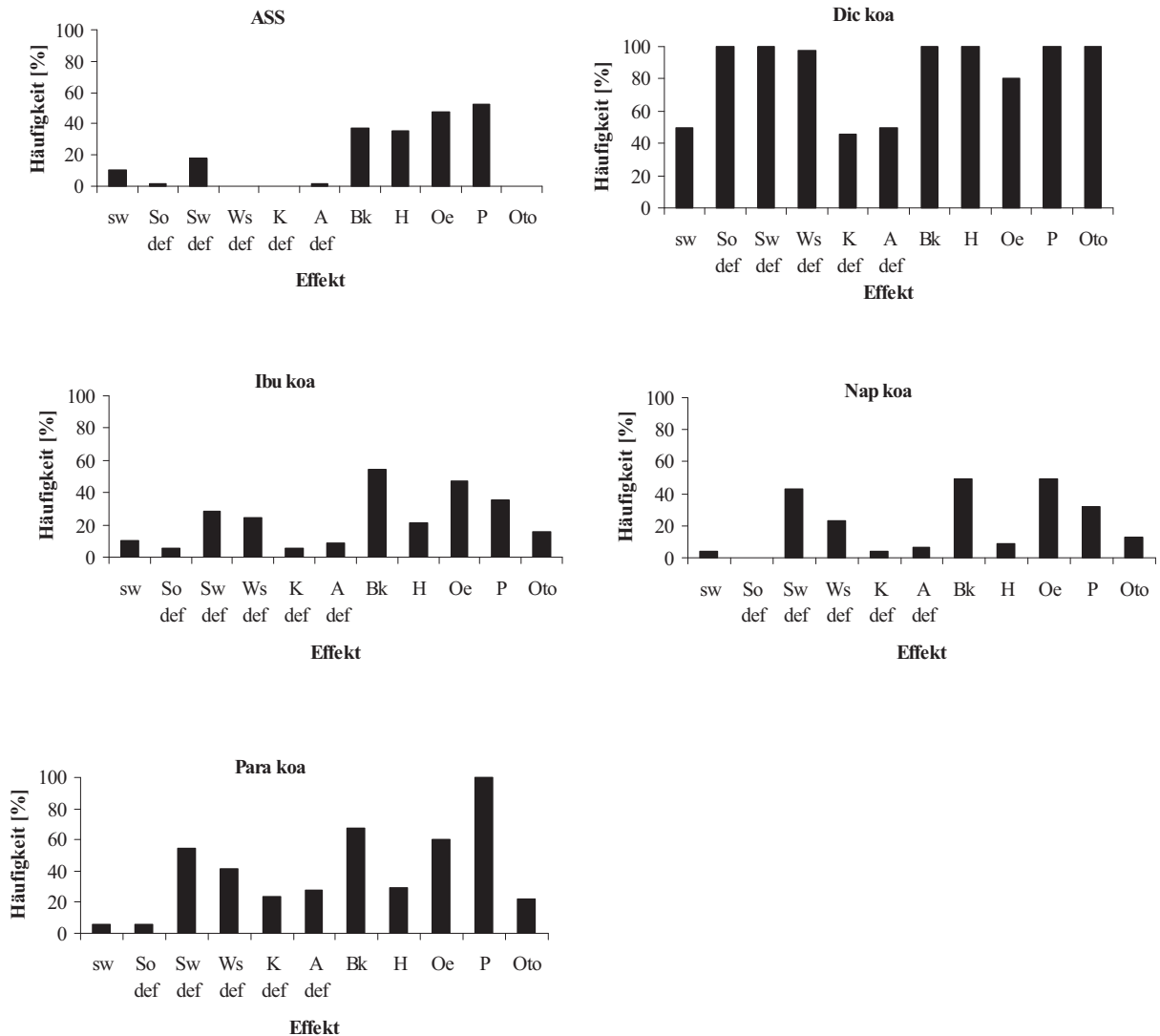


Abbildung 3-11: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den fünf Einzelstoffen der Gruppe der Analgetika unter ausschließlicher Berücksichtigung der koagulierten Embryonen: a) Acetylsalicylsäure b) Diclofenac; c) Ibuprofen; d) Naproxen; e) Paracetamol (ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; koa: nur die koagulierten Embryonen als letale gewertet; sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

Für den Säuger wird in der Literatur für alle fünf Substanzen ein einheitlicher Wirkmechanismus beschrieben. Alle fünf hemmen die Cyclooxygenase-Enzyme (COX-1; COX-2), wodurch es zur Hemmung der Prostaglandin- und Thromboxansynthese aus Arachidonsäure kommt. Darüber kommt es dann zur Einflussnahme auf entzündliche Prozesse und Fieber. Beim Menschen sind die meisten beobachteten Nebenwirkungen auf diesen Prozess zurückzuführen (Forth et al., 2001). Beide COX-Enzyme konnten auch bei Fischen nachgewiesen werden (Fent et al., 2006). Informationen darüber, inwieweit diese jedoch im Fisch die selbe Funktion besitzen und ob beide Enzyme im Fischembryo bereits angelegt sind, konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Daneben wird in der Literatur eine membranstabilisierende Wirkung der Analgetika diskutiert. Paracetamol wird zudem in geringem Umfang durch CYP450-Oxygenasen in N-Acetyl-p-benzochinonimin umgewandelt. Dieses wird normalerweise durch Glutathion inaktiviert und anschließend als Mercaptursäurekonjugat mit dem Harn ausgeschieden. Bei einer Überdosierung sind die Glutathionreserven in der Leber jedoch relativ schnell erschöpft und das überschüssige N-Acetyl-p-benzochinonimin bindet kovalent an die Leberzellproteine mit der Folge einer Leberzellnekrose (Forth et al., 2001).

3.1.2 Antibiotika

3.1.2.1 Chloramphenicol

Chloramphenicol wurde in den Konzentrationen 3438,9 µmol/L, 5158,4 µmol/L, 7737,5 µmol/L, 11606,3 µmol/L sowie 17409,5 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 10 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen weder letale noch subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-34 zusammengefasst. Ab 5158,4 µmol/L zeigte sich eine Zunahme der letalen Effekte, wobei deutliche letale Effekte erst nach 48 Stunden zu beobachten waren. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 10089,8 µmol/L (r^2 : 0,772; b: 2,637; LC_{10} : 3311,7 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-34: Zusammenstellung der letalen Effekte von Chloramphenicol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	3438,9	5158,4	7737,5	11606,3	17409,5
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	3/20
	48	-	-	4/20	11/20	10/20	14/20
gesamt [%]	48	-	-	20	55	50	70

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-35 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich konzentrationsabhängig Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Somiten, Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule. Die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems, der Pigmentierung und auch der Otolithen war bis in die niedrigste untersuchte Konzentration beeinträchtigt. Auch waren Ödeme ab der niedrigsten untersuchten Konzentration zu beobachten.

Tabelle 3-35: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Chloramphenicol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	3438,9	5158,4	7737,5	11606,3	17409,5
keine Schwanzablösung	24	-	-	1/20	6/20	11/20	18/19
	36	-	-	1/20	6/20	11/20	17/17
	48	-	1/19	-	1/9	2/20	5/6
keine oder deformierte Somiten	24	-	-	-	19/20	20/20	19/19
	36	-	-	-	19/20	20/20	17/17
	48	-	3/19	8/16	4/9	2/20	6/6
keine oder deformierte Augenanlage	24	-	-	7/20	19/20	20/20	19/19
	36	-	-	2/20	19/20	20/20	17/17
	48	-	-	6/16	7/9	9/10	6/6
kein oder deformierter Kopf	24	-	-	2/20	7/20	15/20	18/19
	36	-	-	1/20	7/20	15/20	17/17
	48	-	3/19	5/16	9/9	10/10	6/6
deformierter Schwanz	24	-	-	4/20	14/20	20/20	19/19
	36	-	-	8/20	14/20	20/20	17/17
	48	-	9/19	13/16	9/9	10/10	6/6
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	2/20	8/19
	36	-	-	1/20	-	2/20	8/17
	48	-	4/19	5/16	3/9	7/10	3/6
kein Herzschlag	36	-	18/19	20/20	20/20	20/20	17/17
	48	-	9/19	13/16	9/9	10/10	6/6
kein Blutkreislauf	36	3/18	19/19	20/20	20/20	20/20	17/17
	48	-	19/19	16/16	9/9	10/10	6/6
keine Pigmentierung	48	-	10/19	16/16	9/9	10/10	6/6
reduzierte Pigmentierung	48	-	9/19	-	-	-	-
Dotterödem	48	-	12/19	4/16	1/9	1/10	-
Perikardödem	48	-	19/19	13/16	5/9	2/10	-
gesamt	48	-	19/19	13/16	5/9	2/10	-
keine/ deformierte Otolithen	48	-	17/19	16/16	9/9	10/10	6/6

Wie Abbildung 3-12 zu entnehmen ist, zeigte sich zudem bis in die niedrigste untersuchte Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Eine Angabe der NOEC ist daher nicht möglich. Mittels Dunetts Test wurde eine LOEC von 3438,9 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

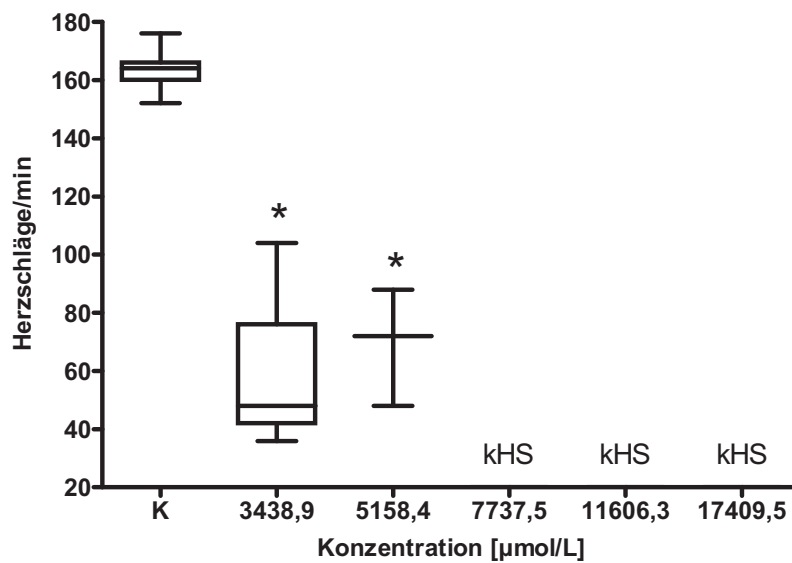


Abbildung 3-12: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Chloramphenicol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-36 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-36: Zusammenfassung der berechneten Werte für Chloramphenicol (aE: alle exponierten Embryonen zeigen diesen Effekt; -: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	10089,8
EC_{50} kein Herzschlag	48	3544,2
EC_{50} Blutkreislauf	48	aE
EC_{50} Ödeme	48	-
EC_{50} Pigmentierung	48	aE
EC_{50} Schwanzdeformation	48	3544,2
EC_{50} Schwanzablösung	48	13986,3
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	11174,8
EC_{50} Augendeformation	48	5935,8
EC_{50} Kopfdeformation	48	5439,1
EC_{50} Otolithen	48	2582,0
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	3438,9

Vergleicht man die ermittelte $LC_{50}(48h)$ von 10089,8 $\mu\text{mol/l}$ mit $EC_{50}(48h)$ -Werten für *Daphnia magna* aus der Literatur (1067,8 - 3389,0 $\mu\text{mol/L}$; Sigma-Aldrich, 2007; arge elbe, 2002), so zeigt sich, dass der Embryo weniger sensitiv reagiert hat.

In der Literatur werden nur wenige Nebenwirkungen von Chloramphenicol beschrieben (EMEA, 2006; Forth et al., 2001). Nach Forth et al. (2001) besitzt die Substanz ein hämatotoxisches Potential. Dabei kann zum einen eine dosisunabhängige Knochenmarksschädigung auftreten, zum anderen eine dosisabhängige reversible Depression der Hämatopoese. Im vorliegenden Test wurde eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems beobachtet. Ob zwischen diesen beobachteten und den in der Literatur beschriebenen Effekten ein Zusammenhang besteht, konnte jedoch nicht geklärt werden. Weitere Nebenwirkungen oder Effekte an Versuchstieren sind nicht beschrieben worden.

3.1.2.2 Clarithromycin

Clarithromycin wurde bis zu seiner Löslichkeitsgrenze in den Konzentrationen 0,8 $\mu\text{mol/L}$, 1,7 $\mu\text{mol/L}$, 3,3 $\mu\text{mol/L}$, 6,7 $\mu\text{mol/L}$ sowie 13,4 $\mu\text{mol/L}$ untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 11 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und nur bei maximal 10,5% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-37 zusammengefasst. Im untersuchten Konzentrationsbereich traten nur vereinzelt letale Effekte an den exponierten Embryonen auf. In den Konzentrationen 6,7 $\mu\text{mol/L}$ und 13,4 $\mu\text{mol/l}$ war nach 48 Stunden jeweils ein Embryo koaguliert. Eine Berechnung einer LC_x ist daher nicht möglich.

Tabelle 3-37: Zusammenstellung der letalen Effekte von Clarithromycin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	0,8	1,7	3,3	6,7	13,4
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	1/20	1/20
gesamt [%]	48	-	-	-	-	5	5

Es traten zudem auch nur vereinzelte subletale Effekte auf, wie in Tabelle 3-38 dargestellt ist. Es zeigte sich nach 24 Stunden bei maximal 15 % der eingesetzten Embryonen und nicht konzentrationsabhängig eine verzögerte Entwicklung der Augenanlage. Ebenfalls konnten zu diesem Zeitpunkt bei einzelnen Keimen Deformationen des Schwanzes beobachtet

werden (max. 10%). Nach 36 Stunden hatten drei Embryonen in der niedrigsten untersuchten Konzentration noch keinen Blutkreislauf ausgebildet. Nach 48 Stunden zeigten in den einzelnen Konzentrationen maximal 21% der eingesetzten Embryonen eine Beeinflussung des Blutkreislaufs, der Pigmentierung und Ödeme. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen ist aufgrund der wenigen beobachteten subletalen Effekte nicht sinnvoll.

Tabelle 3-38: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Clarithromycin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	0,8	1,7	3,3	6,7	13,4
deformierte Augenanlage	24	-	1/20	1/19	3/20	1/20	2/20
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Schwanz	24	-	1/20	-	2/20	-	2/20
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
kein Blutkreislauf	36	-	3/20	-	-	-	-
	48	1/19	2/20	1/19	1/20	1/19	4/19
keine Pigmentierung	48	1/19	-	-	-	-	1/19
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	1/19	-	-	-
Dotterödem	48	2/19	3/20	1/19	1/20	1/20	4/19
Perikardödem	48	2/19	3/20	1/19	1/20	1/20	4/19
gesamt	48	2/19	3/20	1/19	1/20	1/19	4/19

Wie Abbildung 3-13 zu entnehmen ist, zeigte sich im untersuchten Konzentrationsbereich, in den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen ein leichter, nicht-signifikanter Anstieg der Herzschlagfrequenz durch Clarithromycin. Die NOEC entspricht damit der höchsten untersuchten Konzentration von 13,4 $\mu\text{mol/L}$. Die Angabe einer LOEC ist nicht möglich.

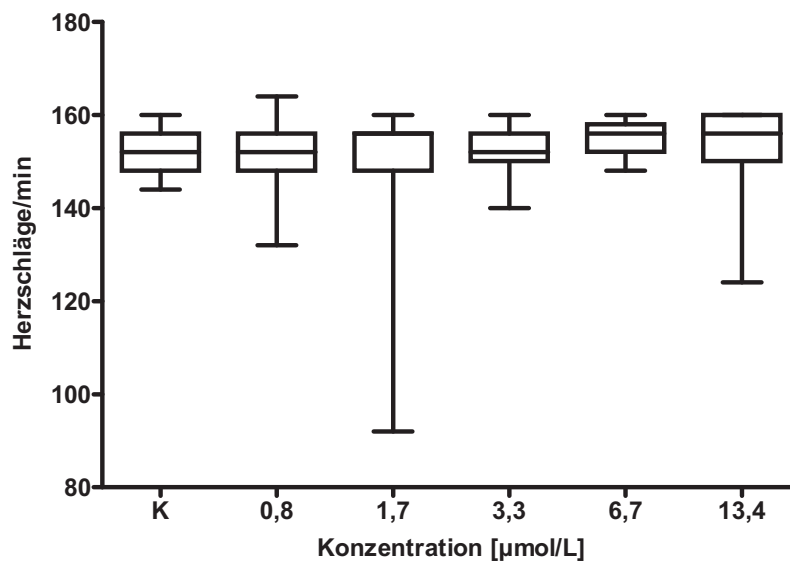


Abbildung 3-13: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clarithromycin- Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle.

Es werden in der Literatur eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben, die bei der Behandlung mit Clarithromycin auftreten können (Sandoz, 2005). In der vorgestellten Untersuchung zeigte sich von diesen Effekten eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems. Im Tierversuch waren an Mäusen teratogene Effekte in Form von Gaumenspalten zu beobachten. Diese traten jedoch erst in hohen Dosen auf. Im vorgestellten Versuch konnten aufgrund der niedrigen eingesetzten Konzentrationen nach 48 Stunden keine teratogenen Effekte beobachtet werden.

3.1.2.3 Erythromycin

Erythromycin wurde bis zu seiner Löslichkeitsgrenze in den Konzentrationen 0,9 µmol/l, 1,7 µmol/L, 3,4 µmol/L, 6,8 µmol/L sowie 13,6 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 19 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5,5% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 5,9% subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-39 zusammengefasst. Im untersuchten Konzentrationsbereich traten nur bei vier Embryonen letale Effekte auf. Nach 48 Stunden war je ein Embryo in der Kontrolle sowie den Konzentrationen 0,9 µmol/L, 1,7

$\mu\text{mol/l}$ und $13,6 \mu\text{mol/L}$ koaguliert. Eine Berechnung von LC_x -Konzentrationen ist daher nicht möglich.

Tabelle 3-39: Zusammenstellung der letalen Effekte von Erythromycin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	0,9	1,7	3,4	6,8	13,6
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	1/18	1/19	1/19	-	-	1/19
gesamt [%]	48	6	5	5	0	0	5

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-40 zusammenfassend dargestellt. Es traten im untersuchten Konzentrationsbereich nur vereinzelt, d.h. bei maximal 17% der eingesetzten Embryonen und nicht konzentrationsabhängig, subletale Effekte auf. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen ist daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-40: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Erythromycin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	0,9	1,7	3,4	6,8	13,6
deformierter Schwanz	24	1/18	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
deformierte Wirbelsäule	24	1/18	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	2/18	-	-	1/18	1/18
keine Pigmentierung	48	-	3/18	1/18	2/20	3/18	-
reduzierte Pigmentierung	48	-	2/18	1/18	1/20	-	1/18
Dotterödem	48	1/17	2/18	-	-	2/18	1/18
Perikardödem	48	1/17	2/18	-	-	2/18	1/18
gesamt	48	1/17	2/18	-	-	2/18	1/18

Wie Abbildung 3-14 zu entnehmen ist, waren die gemessenen Herzschlagfrequenzen in den einzelnen Konzentrationen gegenüber denen der Kontrolle leicht, jedoch nicht signifikant erhöht. Die NOEC entspricht der höchsten untersuchten Konzentration von $13,6 \mu\text{mol/L}$. Die Angabe einer LOEC war daher nicht möglich.

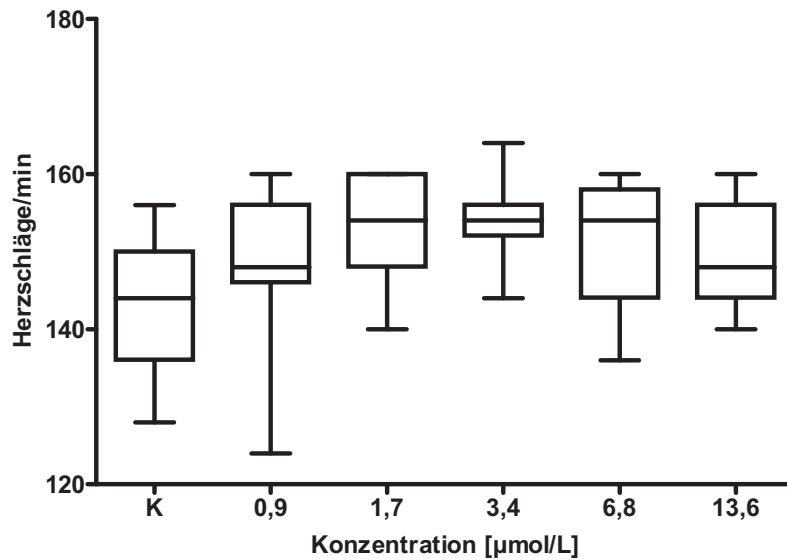


Abbildung 3-14: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Erythromycin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle.

Es war nicht zu klären, ob die wenigen und nicht-konzentrationsabhängig aufgetretenen Effekte auf die Wirkung der Substanz zurückzuführen sind. Anhand von Literaturdaten waren keine Rückschlüsse auf die im Test beobachteten Effekte möglich. Es werden keine spezifischen Effekte von Erythromycin beschrieben, die eine Erklärung für die beobachteten subletalen Effekte liefern könnten (EMA, 2000b, c). Die einzige, in der Literatur beschriebene „Nebenwirkung“, die auch beim Embryo zu beobachten war, war die von Abbott (2004) beschriebene Tachyarrhythmie, d.h. eine Mischung aus Tachykardie (beschleunigter Puls, Abbildung 3-14) und Arrhythmien (langsame und schnellere Phasen, subjektiv).

3.1.2.4 Oxytetracyclin

Aufgrund der niedrigen pH-Werte (<4) der einzelnen Verdünnungsstufen, die im Vorversuch festgestellt wurden, wurden zwei verschiedene Ansätze der Substanz untersucht. In einem Versuch wurde der pH-Wert der Stammlösung nicht eingestellt. In einem zweiten Versuch wurde der pH der Stammlösung mit 0,1N NaCl-Lösung auf 7,2 eingestellt.

3.1.2.4.1 ohne pH-Wert-Einstellung

Die Substanz wurde in den Konzentrationen 150,9 µmol/l, 301,9 µmol/L, 603,7 µmol/L, 1207,5 µmol/L sowie 2515 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Aufgrund des geringen pH-Wertes der Stammlösung und damit der Konzentrationen 301,9 µmol/L bis 2515 µmol/L ist eine Beeinträchtigung der Embryonen durch den niedrigen pH-Wert nicht auszuschließen. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 31 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden bei nur 5% der eingesetzten Embryonen letale und keine subletalen Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-41 zusammengefasst. Ab 301,9 µmol/L zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Nach 48 Stunden waren in der höchsten Konzentration alle eingesetzten Embryonen koaguliert. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 1019,2 µmol/L (r^2 : 0,927; b: 6,049; LC_{10} : 626,1 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-41: Zusammenstellung der letalen Effekte von Oxytetracyclin im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	150,9	301,9	603,7	1207,5	2515,0
Koagulation	4	-	-	-	-	-	10/20
	8	1/20	-	-	2/20	4/20	20/20
	12	1/20	-	-	2/20	6/20	20/20
	24	1/20	-	3/20	2/20	13/20	20/20
	36	1/20	-	3/20	2/20	14/20	20/20
	48	1/20	-	3/20	2/20	14/20	20/20
gesamt [%]	48	5	-	15	10	70	100

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-42 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich vereinzelt und nicht konzentrationsabhängig Deformationen an Somiten, Augen, Schwanz und Wirbelsäule. Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem und Ödeme traten ab 301,9 µmol/L auf. Die Pigmentierung war bei einem einzelnen Embryo in 1207,5 µmol/L reduziert. Aufgrund der wenigen beobachteten subletalen Effekte ist eine Berechnung von Effektkonzentrationen nicht sinnvoll.

Tabelle 3-42: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Oxytetracyclin im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	150,9	301,9	603,7	1207,5	2515,0
deformierte Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	koa
	36	-	-	-	1/18	-	koa
	48	-	-	-	1/18	-	koa
deformierte Augenanlage	24	-	-	1/17	-	-	koa
	36	-	-	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	-	1/18	-	koa
	36	-	-	1/17	4/18	-	koa
	48	-	-	2/17	2/18	-	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	1/18	-	koa
	36	-	-	-	3/18	-	koa
	48	-	-	-	1/18	-	koa
kein Blutkreislauf	36	6/19	6/20	9/17	13/18	5/6	koa
	48	-	-	2/17	1/18	1/6	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	1/6	koa
Dotterödem	48	-	-	2/17	1/18	1/6	koa
Perikardödem	48	-	-	2/17	1/18	1/6	koa
gesamt	48	-	-	2/17	1/18	1/6	koa

Wie Abbildung 3-15 zu entnehmen ist, zeigte sich ab 301,9 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 150,9 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 301,9 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

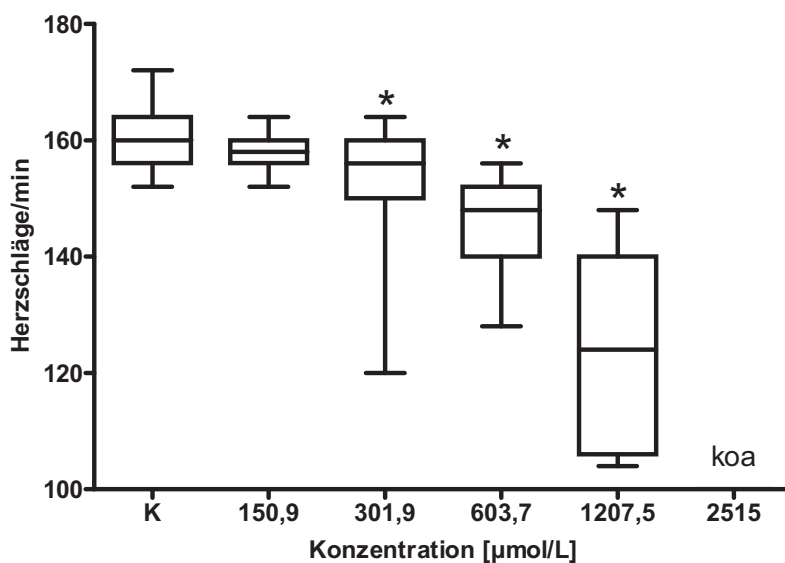


Abbildung 3-15: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Oxytetracyclin- Konzentration im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

3.1.2.4.2 mit pH-Wert-Einstellung

In diesem Versuch wurde die Substanz in den Konzentrationen 503,1 µmol/L, 1006,2 µmol/L, 2012,5 µmol/L, 4025 µmol/L sowie 8050 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Der pH-Wert der Stammlösung wurde vor Versuchsbeginn mit 0,1N NaOH-Lösung auf 7,2 eingestellt. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 32 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine letalen und nur bei maximal 5,6% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-43 zusammengefasst. Es zeigten sich erst in beiden höchsten untersuchten Konzentrationen deutliche letale Effekte (> 10%), wobei in diesen beiden Konzentrationen alle eingesetzten Embryonen innerhalb von 36 Stunden koagulierten. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 2846,1 µmol/L ($r^2: 1,000$; $b: 20,531$; $LC_{10}: 2465,5$ µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-43: Zusammenstellung der letalen Effekte von Oxytetracyclin im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	503,1	1006,2	2012,5	4025,0	8050,0
Koagulation	4	-	-	-	-	-	1/20
	8	-	-	-	-	-	17/20
	12	-	-	-	-	-	20/20
	24	-	1/20	-	-	8/20	20/20
	36	-	1/20	-	-	20/20	20/20
	48	-	1/20	-	-	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	5	-	-	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in

Tabelle 3-44 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich nur wenige und zudem nicht konzentrationsabhängig subletale Effekte. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-44: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Oxytetracyclin im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	503,1	1006,2	2012,5	4025,0	8050,0
deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	7/12	koa
	36	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	7/12	koa
	36	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	6/18	1/19	1/20	1/20	koa	koa
	48	1/18	1/19	-	1/20	koa	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	1/20	koa	koa
Dotterödem	48	1/18	1/19	-	1/20	koa	koa
Perikardödem	48	1/18	1/19	-	1/20	koa	koa
gesamt	48	1/18	1/19	-	1/20	koa	koa

Wie Abbildung 3-16 zu entnehmen ist, zeigte sich ab 1006,24 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 503,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 1006,2 $\mu\text{mol/L}$ berechnet.

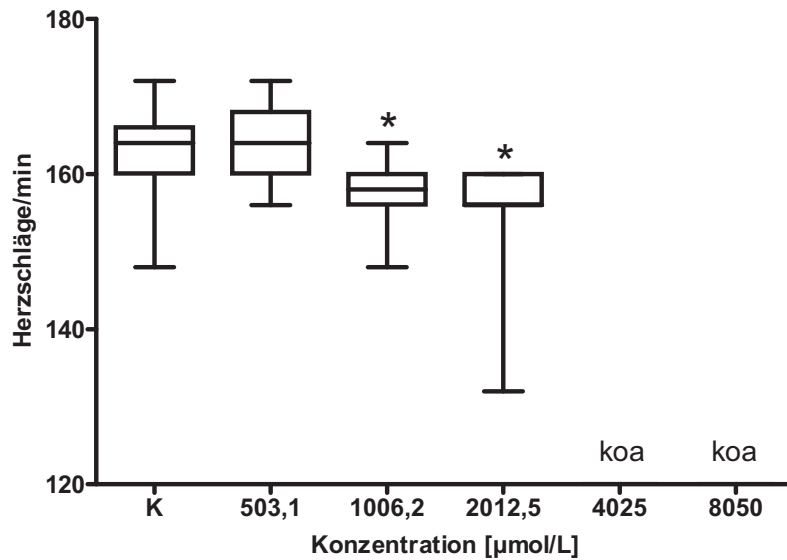


Abbildung 3-16: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Oxytetracyclin-Konzentration im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Vergleicht man die beiden durchgeführten Versuche, so war Oxytetracyclin im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes erwartungsgemäß toxischer für die Embryonen als im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (Tabelle 3-45).

Tabelle 3-45: Darstellung der berechneten $LC_{50}(48h)$ -, NOEC und LOEC-Werte aus den beiden durchgeführten Versuchen mit Oxytetracyclin.

	ohne pH-Einstellung	mit pH-Einstellung
$LC_{50}(48h)$	1019,2	2846,1
NOEC (Herzschlagfrequenz)	150,9	503,1
LOEC (Herzschlagfrequenz)	301,9	1006,2

Da die pH-Werte ab der Konzentration 301,9 µmol/L im Versuch ohne pH-Einstellung unter 5 lagen, ist unklar, ob die beobachteten Effekte auf die Wirkung der Substanz oder auf die des pH zurückzuführen sind. Für eine Wirkung der Substanz sprechen jedoch die beobachteten subletalen Effekte in beiden Versuchen. In beiden Tests zeigten sich, wenn auch nur bei einzelnen Embryonen, Deformationen an Somiten, Augen, Schwanz und Wirbelsäule, eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Blutkreislaufs und der Pigmentierung sowie Ödeme.

3.1.2.5 Roxithromycin

Aufgrund des $\log K_{ow}$ der Substanz wurden zwei unterschiedliche Ansätze untersucht. In einem Ansatz wurden die Embryonen in Wellplatten exponiert, in einem zweiten in Rollrandgläsern. Roxithromycin wurde in beiden Versuchen bis zu seiner Löslichkeitsgrenze in den Konzentrationen 0,8 $\mu\text{mol/l}$, 1,5 $\mu\text{mol/L}$, 3,0 $\mu\text{mol/L}$, 6,0 $\mu\text{mol/L}$ sowie 12,0 $\mu\text{mol/L}$ getestet.

3.1.2.5.1 Versuch in der Wellplatte

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 37 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und nur bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-46 zusammengefasst. Im untersuchten Konzentrationsbereich traten nur wenige letale Effekte an den exponierten Embryonen auf. Eine Berechnung einer LC_{50} war daher nicht möglich.

Tabelle 3-46: Zusammenstellung der letalen Effekte von Roxithromycin während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	0,8	1,5	3,0	6,0	12,0
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	1/19	-	-	-	-
	12	-	1/19	-	-	-	-
	24	-	1/19	-	-	-	-
	36	-	1/19	-	-	-	-
	48	-	1/19	-	-	1/20	1/20
gesamt [%]	48	-	5	-	-	5	6

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-47 zusammenfassend dargestellt. Effekte traten dabei nur bei maximal 10,5% der Embryonen und nicht konzentrationsabhängig auf, so dass keine Effektkonzentrationen berechnet werden konnten.

Tabelle 3-47: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Roxithromycin während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	0,5	1,5	3,0	6,0	12,0
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	-
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	-
deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	-
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	-
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	-
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	1/20	-	1/19	-	-	-
keine Pigmentierung	48	-	-	1/19	-	-	-
reduzierte Pigmentierung	48	1/20	-	-	-	-	-
Dotterödem	48	1/20	-	2/19	-	-	-
Perikardödem	48	1/20	-	2/19	-	-	-
gesamt	48	1/20	-	2/19	-	-	-

Wie Abbildung 3-17 zu entnehmen ist, zeigte sich in der Konzentration 1,5 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Williams-Test wurde eine NOEC von 12,0 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt, die der höchsten untersuchten Konzentration entspricht.

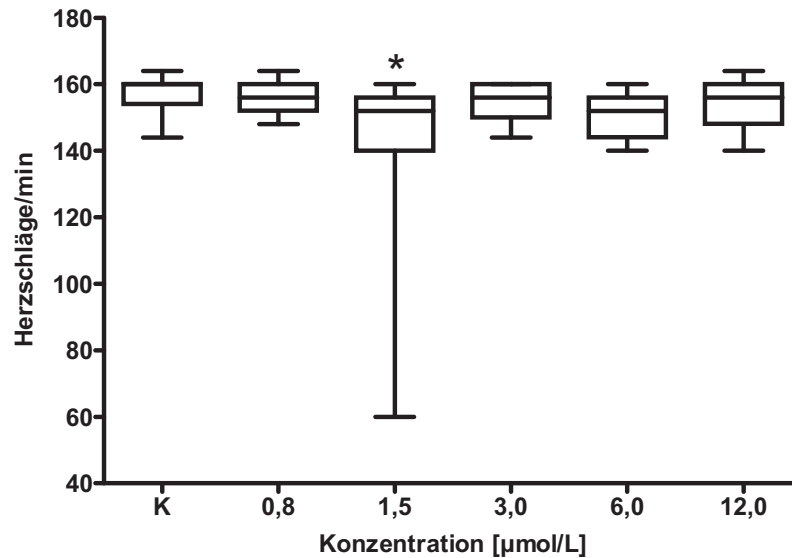


Abbildung 3-17: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Roxithromycin-Konzentration beim Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Williams-Test).

3.1.2.5.2 Versuch im Rollrandglas

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen vor Testbeginn in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 38 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen weder letale noch subletale Effekte an den eingesetzten Embryonen zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-48 zusammengefasst. Im untersuchten Konzentrationsbereich traten nur bei einem einzigen Embryo in 6 µmol/L letale Effekte auf. Eine Berechnung einer LC_{50} war daher nicht möglich.

Tabelle 3-48: Zusammenstellung der letalen Effekte von Roxithromycin während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	0,8	1,5	3,0	6,0	12,0
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	1/9	-
gesamt [%]	48	-	-	-	-	11,1	-

Während der 48-stündigen Exposition der Embryonen in den Rollrandgläsern traten keine subletalen Effekte auf. Die einzigen Auffälligkeiten, die nach 48 Stunden beobachtet werden konnten, waren der vorzeitige Schlupf von drei Embryonen in der Kontrolle sowie eines Embryos in der Konzentration 1,5 $\mu\text{mol/L}$.

Wie Abbildung 3-18 zu entnehmen ist, zeigte sich im untersuchten Konzentrationsbereich ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Die NOEC entspricht damit der höchsten untersuchten Konzentration von 12 $\mu\text{mol/L}$.

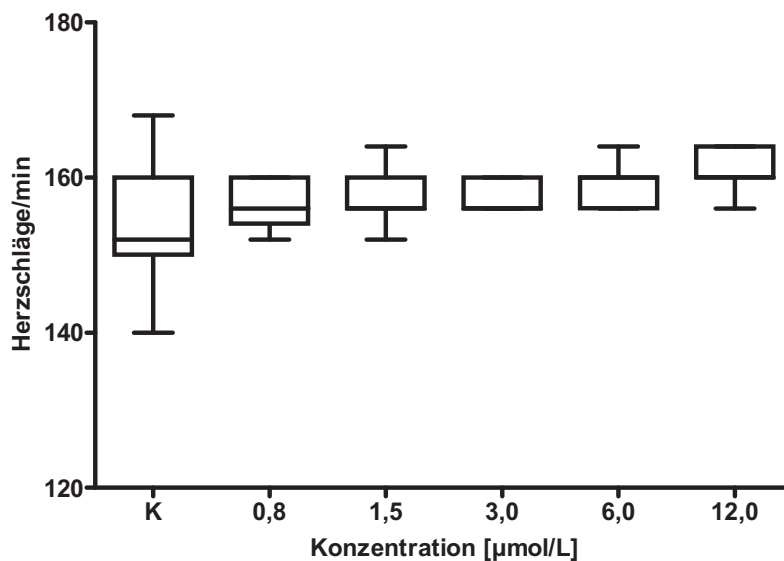


Abbildung 3-18: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Roxithromycin-Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.

Es haben sich aus den beiden Versuchen keine Hinweise darauf ergeben, dass die Lipophilie der Substanz das Ergebnis des Versuchs in der Wellplatte beeinflusst haben könnte. Es konnten in beiden Versuchen nur wenige Effekte beobachtet werden. Es war nicht zu klären, ob diese wenigen Effekte auf eine substanzspezifische Wirkung zurückzuführen sind. Es wurden keine spezifischen Effekte von Roxithromycin beschrieben, die eine Erklärung für die beobachteten subletalen Effekte liefern könnten (Aventis Pharma, 2001).

3.1.2.6 Sulfamethoxazol

Sulfamethoxazol wurde bis zu seiner Löslichkeitsgrenze in den Konzentrationen 197,4 $\mu\text{mol/L}$, 394,8 $\mu\text{mol/L}$, 789,6 $\mu\text{mol/L}$, 1579,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie 3158,2 $\mu\text{mol/L}$ untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 40 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen weder letale noch subletale Effekte zu beobachten waren.

Im untersuchten Konzentrationsbereich traten keine letalen Effekte auf. Es konnten auch nur vereinzelt subletale Effekte beobachtet werden, wie Tabelle 3-49 zu entnehmen ist. Lediglich nach 48 Stunden zeigten sich in der höchsten untersuchten Konzentration von 3158,2 µmol/L deutliche subletale Effekte (> 10%) bei den Endpunkten „fehlender Blutkreislauf“ (30%), „reduzierte Pigmentierung“ (15%) und „Ödeme“ (35%). Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-49: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Sulfamethoxazol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	197,4	394,8	789,6	1579,1	3158,2
keine Gastrulation	8	-	-	1/20	2/20	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	1/20
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	1/20
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	1/20
	36	-	-	-	-	-	1/20
	48	-	-	-	-	-	1/20
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	1/20	6/20
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	-
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	3/20
Dotterödem	48	-	-	-	-	1/20	6/20
Perikardödem	48	-	-	-	-	1/20	7/20
gesamt	48	-	-	-	-	1/20	7/20

Wie Abbildung 3-19 zu entnehmen ist, zeigte sich in der höchsten untersuchten Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 1579,1 µmol/L sowie eine LOEC von 3158,2 µmol/L ermittelt.

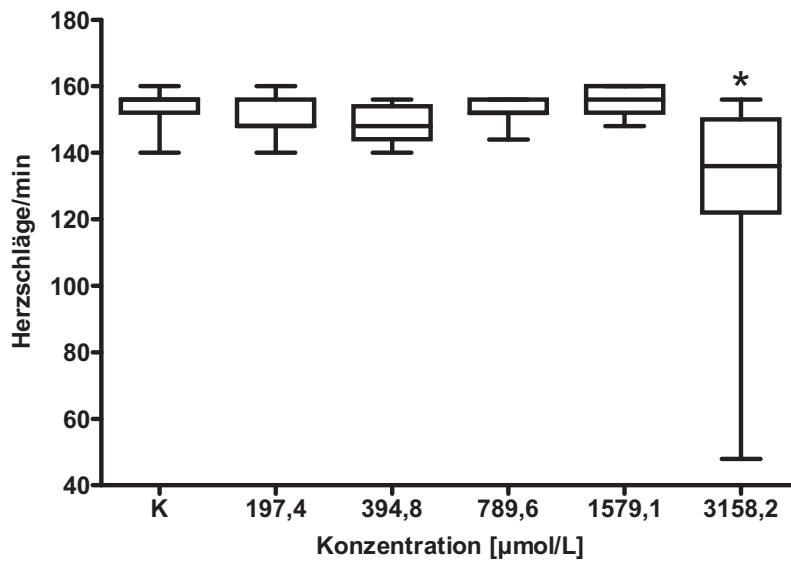


Abbildung 3-19: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Sulfamethoxazol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).

Liebig (2005) untersuchte die Toxizität von Sulfamethoxazol ebenfalls an Embryonen des Zebrafisches in einer Konzentration von 395 µmol/L. Auch in dieser Untersuchung waren außer einem Perikardödem bei einem Embryo und einer leicht erhöhten mittleren Herzschlagfrequenz nach 48 Stunden keine Effekte an den Embryonen zu beobachten. In der Literatur werden für die Anwendung des Kombinationspräparates aus Sulfamethoxazol und Trimethoprim eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben (Grossmann, 2002). Im Embryotest konnte von diesen Effekten nur die Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems festgestellt werden.

3.1.2.7 Trimethoprim

Die Substanz wurde bis zu ihrer Löslichkeitsgrenze, in den Konzentrationen 64,6 µmol/L, 129,2 µmol/L, 258,3 µmol/L, 516,7 µmol/L sowie 1033,3 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 45 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen weder letale noch subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-50 zusammengefasst. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, traten im untersuchten Konzentrationsbereich nur vereinzelt, d.h. bei maximal 10,5% der Embryonen einer Konzentration und nicht konzentrationsabhängig, letale Effekte auf. Eine Berechnung der LC₅₀(48h) war daher nicht möglich.

Tabelle 3-50: Zusammenstellung der letalen Effekte von Trimethoprim (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	64,6	129,2	258,3	516,7	1033,3
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	1/19	-	1/20	-
	36	-	-	2/19	-	1/20	-
	48	-	1/20	2/19	-	1/20	-
gesamt [%]	48	-	5	11	-	5	-

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-51 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich auch hier nach 48 Stunden nicht konzentrationsabhängig nur vereinzelte Effekte bei maximal 12% der eingesetzten Embryonen. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-51: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Trimethoprim (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	64,6	129,2	258,3	516,7	1033,3
deformierter Schwanz	24	-	-	1/18	-	1/19	-
	36	-	-	-	-	1/19	-
	48	-	-	-	-	1/19	-
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	1/18	-	1/19	-
	36	-	-	-	-	1/19	-
	48	-	-	-	-	1/19	-
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	1/19	-
kein Blutkreislauf	36	2/19	3/20	3/17	6/17	6/19	2/20
	48	-	1/19	2/17	1/17	1/19	-
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	-
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	2/17	1/19	-
Dotterödem	48	-	-	2/17	1/17	-	-
Perikardödem	48	-	1/19	2/17	1/17	-	-
gesamt	48	-	1/19	2/17	1/17	-	-
keine Otolithen	48	-	-	-	-	1/19	-

Wie Abbildung 3-20 zu entnehmen ist, zeigte sich bis in die niedrigste untersuchte Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Eine Angabe einer NOEC ist daher nicht möglich. Mittels Dunetts Test wurde eine LOEC von 64,6 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

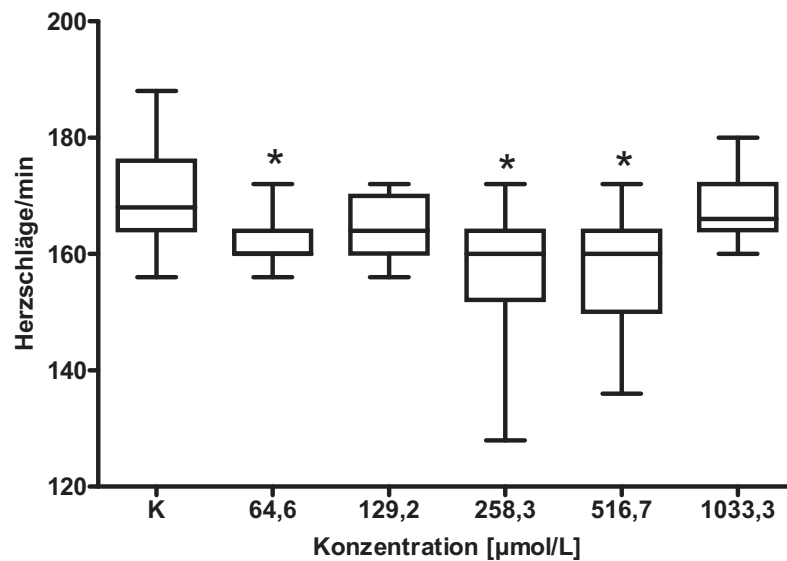


Abbildung 3-20: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Trimethoprim-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).

In der Literatur werden für die Anwendung des Kombinationspräparates aus Sulfamethoxazol und Trimethoprim eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben (Grossmann, 2002). Im Embryotest konnte von diesen Effekten nur die Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems festgestellt werden.

3.1.2.8 Antibiotika- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden die Makrolid-Antibiotika Chloramphenicol, Clarithromycin, Erythromycin und Roxithromycin sowie Oxytetracyclin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim als Einzelstoffe untersucht. Für Oxytetracyclin und Roxithromycin wurden zwei Versuche durchgeführt. Bei der Untersuchung von Oxytetracyclin wurde in einem Versuch der pH-Wert der Stammlösung nicht, in einem zweiten Versuch auf 7,2 eingestellt. Bei der Untersuchung von Roxithromycin erfolgte die Exposition der Embryonen einmal im Rollrandglas, einmal in der Wellplatte.

Anhand der ermittelten LC_{50} -Werte lässt sich feststellen, dass Oxytetracyclin in den beiden durchgeführten Versuchen, mit und ohne Einstellung des pH-Wertes, toxischer war als Chloramphenicol (Tabelle 3-52). Für die übrigen untersuchten Antibiotika war die Untersu-

chung nur bis zur Löslichkeitsgrenze möglich. In den untersuchten Konzentrationsbereichen wurden nur vereinzelt letale Effekte beobachtet.

Tabelle 3-52: Darstellung der anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten $LC_{50}(48h)$ -Werte für die untersuchten Antibiotika (Chlora: Chloramphenicol; Clarithro: Clarithromycin; Erythro: Erythromycin; mpH: mit pH-Einstellung; opH: ohne pH-Einstellung; Oxytetra: Oxytetracyclin; Roxithro: Roxithromycin; Sulfame: Sulfamethoxazol; Trimetho: Trimethoprim).

$LC_{50}(48h), [\mu\text{mol/L}]$						
Chlora	Clarithro	Erythro	Oxytetra	Roxithro	Sulfame	Trimetho
10089,8	>13,4	>13,6	1019,2 opH 2846,1 mpH	>12	>3158,2	>1033,3

Vergleicht man die beobachteten subletalen Effekte, so konnten nur im Versuch mit Chloramphenicol deutliche Effekte beobachtet werden (Abbildung 3-21).

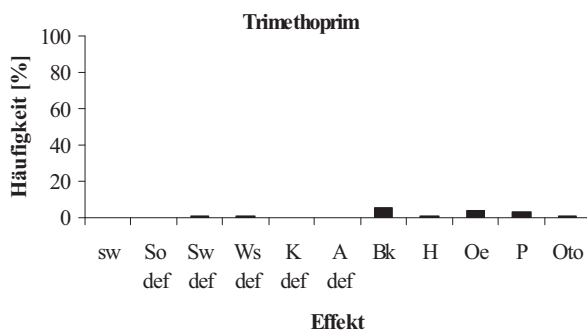
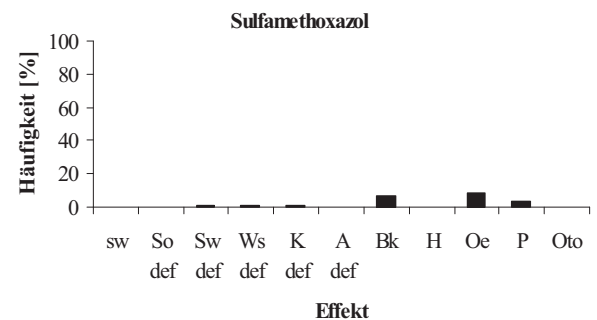
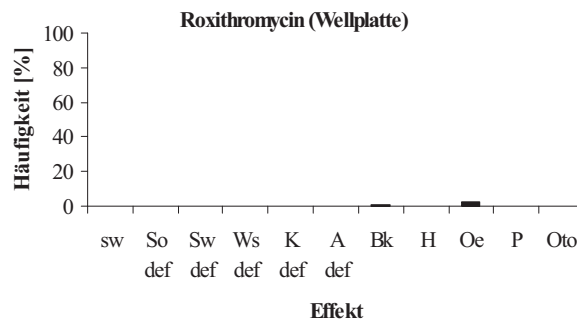
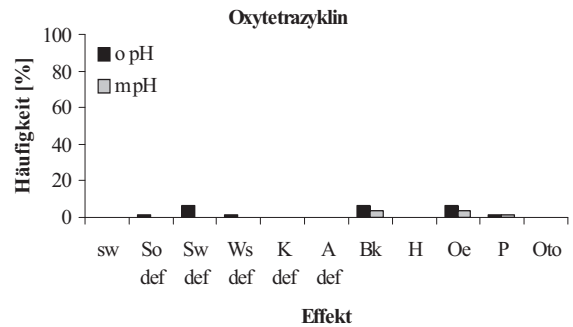
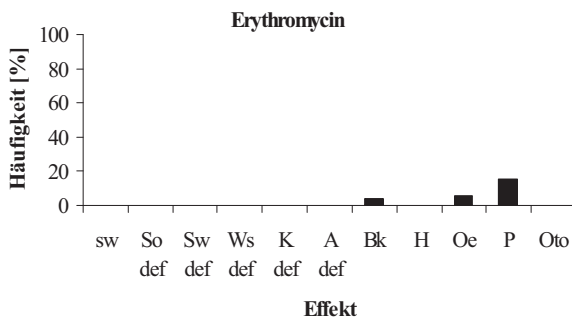
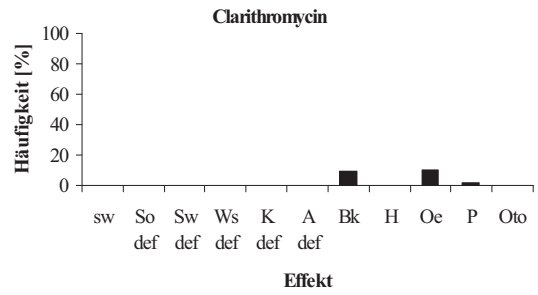
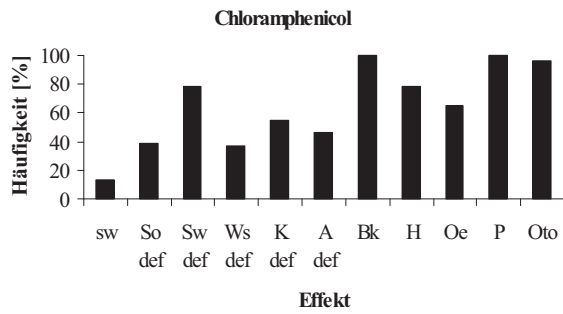


Abbildung 3-21: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den Einzelstoffen der Gruppe der Antibiotika (mpH: Versuch mit Einstellung des pH-Wertes; opH: Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes; sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

In der Literatur werden für die sieben untersuchten Substanzen verschiedene Wirkmechanismen beschrieben. Die 50 S-Untereinheit der bakteriellen 70 S-Ribosomen sind der Ansatzpunkt der antibakteriellen Wirkung der Makrolide. Chloramphenicol, Clarithromycin, Erythromycin und Roxithromycin hemmen die Proteinbiosynthese nach Bindung an die 50 S-Untereinheit. Die Proteinsynthese wird während der Elongationsphase der Polypeptidkette am Ribosom unterbrochen. Durch ihre Bindung blockieren sie die Translokation der Peptidyl-t-RNA von der Akzeptor- zur Donorstelle. Die Fixierung der Peptidyl-t-RNA an der Akzeptorstelle führt zur Arretierung der Proteinsynthese auf der Polypeptid-Zwischenstufe und resultiert in der Bakteriostase.

Oxytetracyclin wirkt bakteriostatisch indem ebenfalls die Proteinsynthese der Bakterien gehemmt wird. Die Substanz gelangt durch energieabhängige Transportsysteme in die bakterielle Zelle und bindet an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen. In hohen Konzentrationen wird auch die Proteinsynthese der Säugerzelle verhindert. Die Substanz bindet dabei an die 80S-Untereinheit der eukaryotischen Ribosomen.

Sulfamethoxazol verdrängt in sensiblen Mikroorganismen p-Aminobenzoesäure kompetitiv aus dem Syntheseweg zur Tetrahydrofolsäure, was eine bakteriostatische Wirkung zur Folge hat. Da der Mensch Folsäure mit der Nahrung aufnimmt, umgeht sein Zellstoffwechsel diesen Sulfonamiddefekt- nicht jedoch Föten im Mutterleib. Die Substanz überwindet die Plazentaschranke und kann auf den fötalen Folsäuremetabolismus eingreifen (Grossmann, 2002). Tetrahydrofolsäure dient als Coenzym der Übertragung aktivierter C₁-Fragmente bei der Synthese von Purinnukleotiden und Thymin. Sulfonamide hemmen damit vorrangig die Neubildung von DNA und RNA und dadurch die Vermehrung der Bakterien.

Trimethoprim ist ein kompetitiver Inhibitor des Enzyms Tetrahydrofolat Reduktase (EMA, 1997). Die Substanz blockiert die empfindlichen Reduktasen mit höherer Affinität als die der menschlichen Zellen. Damit ist keine Thyminsynthese mehr möglich. Sulfamethoxazol und Trimethoprim werden in der Regel als Kombinationspräparat eingesetzt. Grossmann (2002) beschreibt einen synergistischen Effekt beider Substanzen, wobei die Wirkung durch die sequentielle Hemmung zweier aufeinanderfolgender Biosyntheseschritte der bakteriellen Tetrahydrofolsäure zustande kommt, wodurch der Aufbau bakterieller Proteine und Ribonukleinsäuren gehemmt wird.

3.1.3 Antidote

3.1.3.1 N-Acetylcystein (ACC)

Aufgrund der niedrigen pH-Werte (<4) der einzelnen Verdünnungsstufen, die im Vorversuch festgestellt wurden, wurden zwei verschiedene Ansätze der Substanz untersucht. In einem Versuch wurde der pH-Wert der Stammlösung nicht eingestellt. In einem zweiten Versuch wurde der pH-Wert der Stammlösung mit 0,1N NaCl-Lösung auf 8 eingestellt.

3.1.3.2 ohne Einstellung des pH-Wertes

In diesem Ansatz wurde Acetylcystein in den Konzentrationen 191,5 µmol/L, 383 µmol/L, 766 µmol/L, 1532 µmol/L sowie 3064 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Aufgrund des geringen pH-Wertes der Stammlösung und damit der einzelnen Verdünnungen kann eine Beeinträchtigung der Embryonen durch den niedrigen pH-Wert nicht ausgeschlossen werden. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 1 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine letalen und nur bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-53 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab 383 µmol/L konzentrations- und zeitabhängig zu. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 1071,1 µmol/L (r^2 : 0,982; b: 3,774; LC_{10} : 490,5 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-53: Zusammenstellung der letalen Effekte von ACC im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	191,5	383	766	1532	3064
Koagulation	4	-	-	-	-	-	10/20
	8	-	-	1/20	2/20	9/20	20/20
	12	-	-	1/20	3/20	9/20	20/20
	24	-	-	1/20	5/20	12/20	20/20
	36	-	-	1/20	6/20	14/20	20/20
	48	-	-	1/20	6/20	14/20	20/20
gesamt [%]	48	-	-	5	30	70	100

In Tabelle 3-54 sind die durch Acetylcystein verursachten subletalen Effekte zusammengefasst. Es zeigten sich nach 48 Stunden nur vereinzelt, d.h. bei maximal 17% und nicht konzentrationsabhängig, subletale Effekte an den exponierten Embryonen. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen ist mit den gezeigten Daten nicht möglich.

Tabelle 3-54: Zusammenstellung der subletalen Effekte von ACC im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum genannten Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	191,5	383	766	1532	3064
keine Schwanzablösung	24	-	-	1/19	-	-	koa
	36	-	-	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
keine Somitenanlage	24	-	-	2/19	-	-	koa
	36	-	-	2/19	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
deformierte Augenanlage	24	-	-	2/19	2/15	-	koa
	36	-	-	2/19	2/14	-	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
deformierter Kopf	24	-	-	1/19	-	-	koa
	36	-	-	1/19	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	4/19	8/15	-	koa
	36	-	-	4/19	8/14	-	koa
	48	-	-	-	1/14	-	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	6/19	8/15	-	koa
	36	-	-	6/19	8/14	-	koa
	48	-	-	2/19	-	-	koa
kein Blutkreislauf	36	16/20	11/20	18/19	14/14	4/6	koa
	48	3/20	-	3/19	-	-	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	3/19	3/14	1/6	koa
Dotterödem	48	2/20	1/20	3/19	-	-	koa
Perikardödem	48	2/20	-	2/19	-	-	koa
gesamt	48	2/20	1/20	3/19	-	-	koa

Anhand der in Abbildung 3-22 dargestellten Herzschlagfrequenzen wurden mittels Dunetts-Test eine NOEC von 191,5 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 383 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

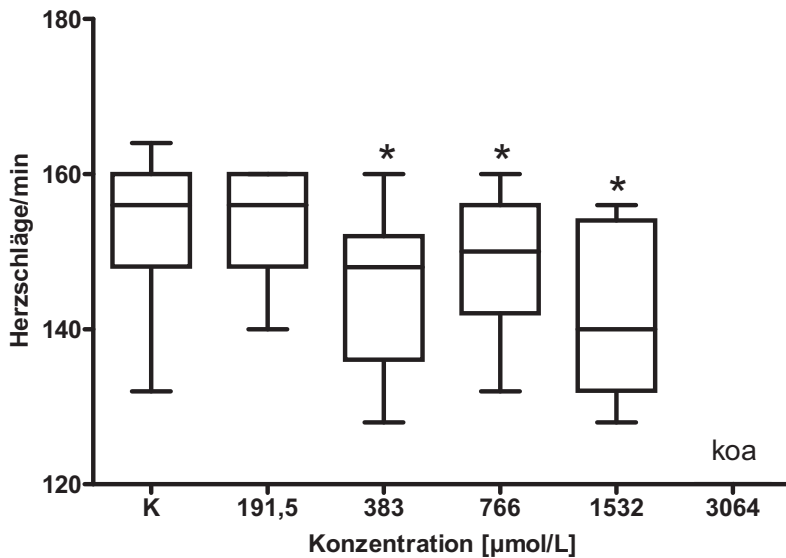


Abbildung 3-22: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der ACC-Konzentration im Versuch Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

3.1.3.3 mit Einstellung des pH-Wertes

In diesem Test wurde die Substanz in den Konzentrationen 3379,5 µmol/L, 6759 µmol/L, 13518 µmol/L, 27036 µmol/L sowie 54072 µmol/L untersucht.

Die Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Der pH-Wert der Stammlösung wurde vor Versuchsbeginn mit 0,1N NaOH- Lösung auf 8 eingestellt. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 2 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden bei maximal 10% der eingesetzten Embryonen letale bzw. subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-55 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen nur in der höchsten untersuchten Konzentration zeitabhängig zu. In den übrigen untersuchten Konzentrationen zeigten sich keine letalen Effekte. Es wurde ein $LC_{50}(48h)$ von 51024,8 µmol/L (r^2 : 0,992; b: 11,203; LC_{10} : 39220,7 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-55: Zusammenstellung der letalen Effekte von Acetylcystein im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	3379,5	6759	13518	27036	54072
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	1/20
	12	-	-	-	-	-	1/20
	24	1/20	-	-	-	-	12/20
	36	2/20	-	-	-	-	12/20
	48	2/20	-	-	-	-	13/20
gesamt [%]	48	10	-	-	-	-	65

Die unter dem Einfluss von Acetylcystein beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-56 zusammengefasst. Es zeigten sich in diesem Versuch nach 4 Stunden Deformationen an der hohen Blastula bei 60% der eingesetzten Embryonen in der höchsten untersuchten Konzentration. Nach 8 Stunden waren 58% der Embryonen dieser Konzentration noch im Stadium der hohen Blastula. Deformationen an Somiten, Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule waren nur bei einzelnen Embryonen in den Konzentrationen 13518 $\mu\text{mol/L}$ bis 54072 $\mu\text{mol/L}$ zu beobachten. Eine Beeinflussung des Herz-Kreislaufsystems und der Pigmentierung sowie Ödeme zeigten sich bis in die niedrigste untersuchte Konzentration, jedoch waren auch hier, mit Ausnahme der Konzentration 54072 $\mu\text{mol/L}$, nach 48 Stunden maximal 15% der eingesetzten Embryonen betroffen. Ab Konzentration 13518 $\mu\text{mol/L}$ waren konzentrationsabhängig bei Embryonen keine Otolithen in den Sacculi angelegt.

Tabelle 3-56: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Acetylcystein im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	3379,5	6759	13518	27036	54072
deformierte hohe Blastula	4	-	-	-	-	-	12/20
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	-	11/19
	12	-	-	-	-	-	11/19
keine oder deformierte Somiten	24	-	-	-	-	1/20	-
	36	-	-	-	-	1/20	-
	48	-	-	-	-	1/20	-
deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	1/20	-
	36	-	-	-	-	2/20	-
	48	-	-	-	-	2/20	4/7
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	1/20	-
	48	-	-	-	1/20	1/20	4/7
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	1/20	-
	36	1/18	-	-	-	2/20	-
	48	1/18	-	-	-	2/20	5/7
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	-
	36	1/18	-	-	-	-	-
	48	1/18	-	-	-	-	1/7
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	2/20	6/7
kein Blutkreislauf	36	6/18	12/19	18/20	13/20	17/20	8/8
	48	1/18	1/19	1/20	2/20	3/20	7/7
keine Pigmentierung	48	2/18	-	3/20	-	2/20	7/7
reduzierte Pigmentierung	48	-	3/19	2/20	1/20	-	-
Dotterödem	48	1/18	1/19	1/20	2/20	1/20	-
Perikardödem	48	1/18	1/19	1/20	2/20	1/20	1/7
gesamt	48	1/18	1/19	1/20	2/20	1/20	1/7
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	1/20	3/20	7/7

Abbildung 3-23 zu entnehmen ist, zeigte sich in der höchsten untersuchten Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 27036 $\mu\text{mol/L}$, sowie eine LOEC von 54072 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

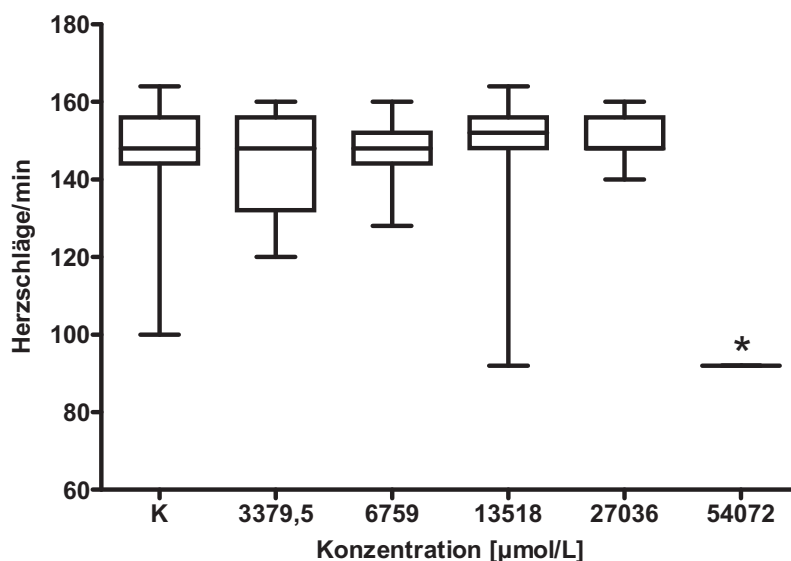


Abbildung 3-23: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der ACC-Konzentration im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-57 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-57: Zusammenfassung der berechneten Werte für ACC im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes.

Effekt	Zeit [h]	EC_{50} (48h); [$\mu\text{mol/L}$]
LC_{50}	48	51024,8
EC_{50} kein Herzschlag	48	39464,9
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	36866,9
EC_{50} Ödeme	48	285974,9
EC_{50} Pigmentierung	48	38234,7
EC_{50} Schwanzdeformation	48	45941,6
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	92784,5
EC_{50} Augendeformation	48	49671,0
EC_{50} Kopfdeformation	48	50505,2
EC_{50} Otolithendeformation	48	35643,5
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	27036
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	54072

Rückschlüsse auf die im Test beobachteten Effekte sind anhand von Literaturdaten nicht möglich. Es wurden keine spezifischen Effekte von ACC beschrieben (EMEA, 2007), die eine Erklärung für die beobachteten subletalen Effekte liefern könnten. Die beobachteten

letalen Effekte sind in dem ersten durchgeführten Test ohne pH-Wert-Einstellung wahrscheinlich auf pH-abhängige Effekte zurückzuführen.

Acetylcystein besitzt eine geringe Toxizität gegenüber Tieren und Menschen (EMEA, 2007) mit einer LD₅₀(oral, Ratte) von 31 mmol/kg (Merck, 2003), was sich auch in den vorgestellten Versuchen mit den Eiern des Zebraäbblings gezeigt hat, jedoch nur in den Versuchen, in denen der pH-Wert der Stammlösung entsprechend eingestellt war (LC₅₀(48h): 51024,8 µmol/L). In den Versuchen ohne pH-Einstellung war die Substanz deutlich toxischer (LC₅₀(48h): 1071,1 µmol/L).

3.1.3.4 Atropin

Die Substanz wurde in den Konzentrationen 6476,5 µmol/L, 9714,8 µmol/L, 14572,1 µmol/L, 21858,2 µmol/L sowie 32787,3 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 4 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden nur bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und keine subletalen Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten und damit letalen Embryonen ist in Tabelle 3-58 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab 14572,1 µmol/L konzentrations- und zeitabhängig zu. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 22543,6 µmol/L (r^2 : 0,992; b: 7,217; LC₁₀: 14984,8 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-58: Zusammenstellung der letalen Effekte von Atropin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	6476,5	9714,8	14572,1	21858,2	32787,3
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	1/19	8/20
	12	-	-	-	-	1/19	11/20
	24	-	-	-	3/20	9/19	18/20
	36	1/20	-	-	3/20	9/19	18/20
	48	1/20	-	-	3/20	9/19	18/20
gesamt [%]	48	5	-	-	15	47,4	90

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-59 zusammenfassend dargestellt. Nach 8 und 12 Stunden waren einzelne Embryonen noch im Stadium der hohen Blastula. Ebenso konnten Deformationen an Augen, Kopf und Schwanz nur bei einzelnen Embryonen beobachtet werden. Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem und die Pigmentierung sowie Ödeme traten auch nur bei wenigen Embryonen auf.

Tabelle 3-59: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Atropin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	6476,5	9714,8	14572,1	21858,2	32787,3
keine Gastrulation	8	-	-	1/20	-	2/18	-
	12	-	-	-	-	1/18	-
deformierte Augenanlage	24	-	-	2/20	2/17	1/10	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	1/2
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	1/2
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	1/2
kein Blutkreislauf	48	-	3/20	1/20	-	-	1/2
keine Pigmentierung	48	-	3/20	4/20	1/17	1/10	2/2
reduzierte Pigmentierung	48	-	2/20	4/20	1/17	-	-
Dotterödem	48	-	3/20	1/20	-	1/10	-
Perikardödem	48	-	2/20	2/20	-	-	-
gesamt	48	-	3/20	2/20	-	1/10	-
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	-	-	1/2

Wie Abbildung 3-24 zu entnehmen ist, zeigte sich ab 9714,8 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 6476,5 $\mu\text{mol/L}$, sowie eine LOEC von 9714,8 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

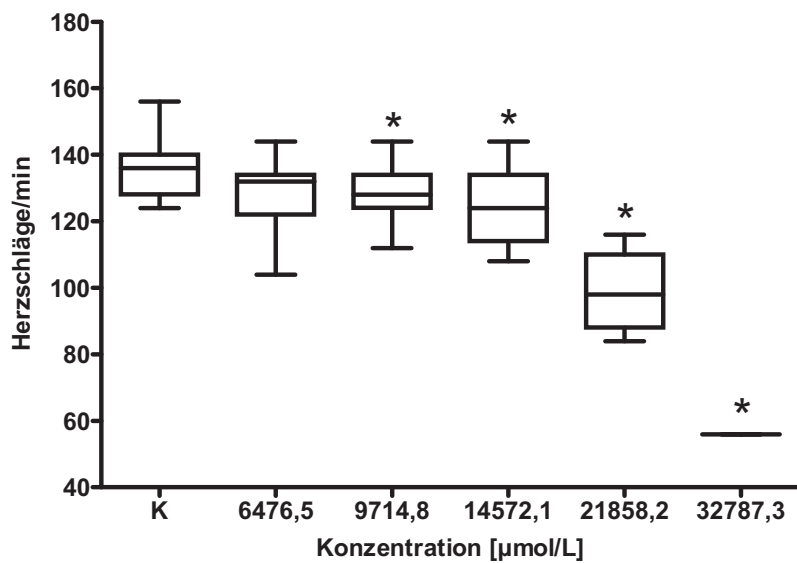


Abbildung 3-24: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Atropin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-60 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-60: Zusammenfassung der berechneten Werte für Atropin.

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	22543,6
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	32787,3
EC_{50} Pigmentierung	48	22967,1
NEOC (Herzschlagfrequenz)	48	6476,5
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	9714,8

In der Literatur werden als Nebenwirkungen der Anwendung von Atropinsulfat sowohl eine geringe Abnahme der Herzfrequenz als auch eine Herzfrequenzsteigerung sowie Arrhythmien beschrieben (Streuli, 2004). In vorgestellten Versuch zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Herzschlagfrequenz.

Auch wurden im Tierversuch teratogene Effekte in Form von Skelettmissbildungen bei Mäusen beobachtet. Im Embryotest zeigten sich lediglich eine verzögerte Entwicklung der Augenanlage sowie vereinzelte Deformationen an Kopf und Schwanz.

3.1.3.5 Antidote- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden die beiden, in der Human- und Veterinärmedizin als Antidote eingesetzten Stoffe Acetylcystein (ACC) und Atropin als Einzelstoffe untersucht. Für ACC wurden zwei Versuche durchgeführt. In einem Versuch wurde der pH der Stammlösung nicht, in einem zweiten auf 8,0 eingestellt.

In Abhängigkeit vom pH-Wert der Testlösungen reagierten die Embryonen empfindlicher auf ACC bzw. Atropin. Ohne Einstellung des pH-Wertes wurde für ACC eine $LC_{50}(48h)$ von 1071,1 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt, mit Einstellung des pH-Wertes eine $LC_{50}(48h)$ von 51024,8 $\mu\text{mol/L}$. Für Atropin wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 22543,6 $\mu\text{mol/L}$ berechnet.

Bei beiden Substanzen waren nach 48 Stunden nur wenige subletale Effekte zu beobachten, wie Abbildung 3-25 zu entnehmen ist. Es zeigten sich bei beiden Substanzen eine Beeinflussung des Herz-Kreislaufsystem und der Pigmentierung sowie Ödeme. Vereinzelt waren bei beiden Stoffen Deformationen sowie fehlende Otolithen zu beobachten. Bei Acetylcystein traten im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes mehr Effekte auf, als im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes.

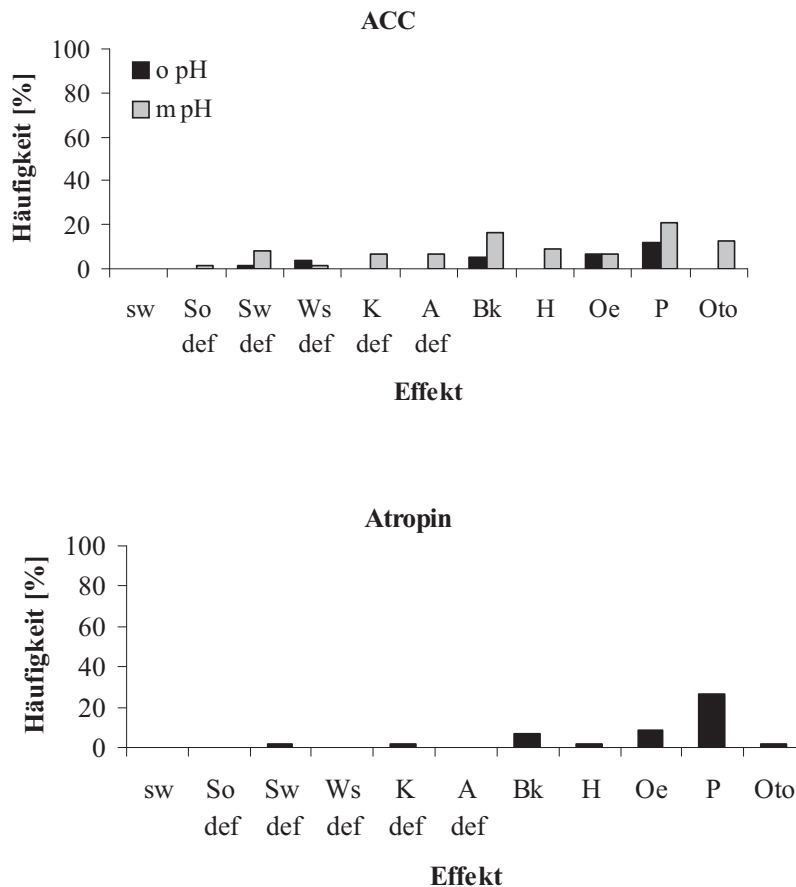


Abbildung 3-25: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den Einzelstoffen der Gruppe der Antidote (m pH: Versuch mit Einstellung des pH-Wertes; o pH: Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes; sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

In der Literatur werden unterschiedliche Wirkmechanismen für beide Substanzen beschrieben. Atropin wird als Muscarinrezeptor-Antagonist eingestuft. Muscarin-Rezeptoren sind Rezeptoren des Acetylcholin, die in der Plasmamembran von Neuronen und allen Zellen, die parasymphatisch innerviert werden (Drüsen-, Herzmuskelzellen, Zellen der glatten Muskulatur) zu finden sind. Atropin ist dabei als kompetitiver Antagonist des freigesetzten Acetylcholins zu verstehen, der seine Wirkung nur dort entfaltet, wo Acetylcholin verdrängt werden kann (anticholinerge Wirkung). Es wird daher als Antidot bei Vergiftungen mit Organophosphaten eingesetzt und hemmt die Giftwirkung funktionell (Forth et al., 2001). Die Substanz ruft eine Reihe von Wirkungen hervor. Für den Embryotest ist jedoch nur die, durch

die Blockade der Rezeptoren am Herzen, hervorgerufene Tachykardie (Beschleunigung der Herzschlagfrequenz) von Bedeutung (Forth et al., 2001).

In der Literatur werden verschiedene Wirkmechanismen von ACC kontrovers diskutiert. Acetylcystein gehört zum einen zur Gruppe der Expektorantien. Dabei handelt es sich um Stoffe, die die Bronchialsekretion steigern. Durch die Gabe von Acetylcystein wird das Bronchialsekret verflüssigt, indem die Disulfidbrücken von Mucoproteiden aufgebrochen und dadurch deren Viskosität verringert wird (Forth et al., 2001). Obwohl diese Wirkung von ACC in der Literatur bezweifelt wird (AVP, 2006), sind Expektorantien nach den Analgetika/Antirheumatika die zweithäufigst verordnete Arzneimittelgruppe (Forth et al., 2001). Zum anderen besitzt die Substanz antioxidative Eigenschaften, wobei ihr sowohl direkte antioxidative als auch indirekt das Glutathionsystem stimulierende Funktionen zugeschrieben werden (AVP, 2006). Die Substanz besitzt eine SH-Gruppe, die leicht oxidiert werden kann. Über die sich dann bildende Disulfidbrücke ergibt sich ein Komplex aus zwei ACC-Molekülen. Dabei werden reaktive Sauerstoffspezies, besonders Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale reduziert und verlieren dadurch ihre Reaktivität. Die wichtigste und für den Menschen einzig nachgewiesene Rolle spielt Acetylcystein bei Vergiftungen mit Paracetamol. Die Substanz gehört zu den Dekorporierungsantidot, d.h. der Giftstoff wird durch chemische Bindung dekorporiert. Im Fall von Paracetamol geht das Antidot mit dem Metaboliten N-Acetyl-p-benzochinonimin über seine SH-Gruppen eine chemische Bindung ein, der dadurch entstehende Komplex ist nicht toxisch (Forth et al., 2001).

3.1.4 Antiepileptika

3.1.4.1 Carbamazepin

Carbamazepin wurde bis zur Löslichkeitsgrenze in den Konzentrationen 52,9 µmol/L, 105,8 µmol/L, 211,6 µmol/L, 423,2 µmol/L sowie 846,5 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 8 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und bei nur 5% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Im untersuchten Konzentrationsbereich traten keine letalen Effekte an den exponierten Embryonen auf.

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-61 zusammengefasst. Vereinzelt zeigten sich Deformationen an Somiten, Schwanz und Wirbelsäule. Auch waren die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems, der Otolithen und der Pigmentierung beeinträchtigt, wobei deutliche Effekt (>10%) erst in den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen (423,2 µmol/L und 846,5 µmol/L) auftraten. Zudem konnten Ödeme beobachtet werden.

Tabelle 3-61: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Carbamazepin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	52,9	105,8	211,6	423,2	846,5
keine oder deformierte Somiten	24	-	-	-	-	-	1/19
	36	-	-	-	-	-	1/19
	48	-	-	-	-	-	1/19
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	1/19
	36	-	-	-	-	-	1/19
	48	-	-	-	-	-	1/19
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	1/20	-
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	13/19
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	1/20	-	2/20	1/20	19/19
keine Pigmentierung	48	-	1/20	3/20	1/20	2/20	-
reduzierte Pigmentierung	48	1/20	-	-	1/20	3/20	19/19
Dotterödem	48	-	1/20	-	2/20	1/20	19/19
Perikardödem	48	-	1/20	-	2/20	1/20	19/19
gesamt	48	-	1/20	-	2/20	1/20	19/19
deformierte Otolithen	48	-	-	-	-	4/20	5/19

Wie Abbildung 3-26 zu entnehmen ist, zeigte sich ab 423,2 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 211,6 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 423,2 $\mu\text{mol/L}$ berechnet.

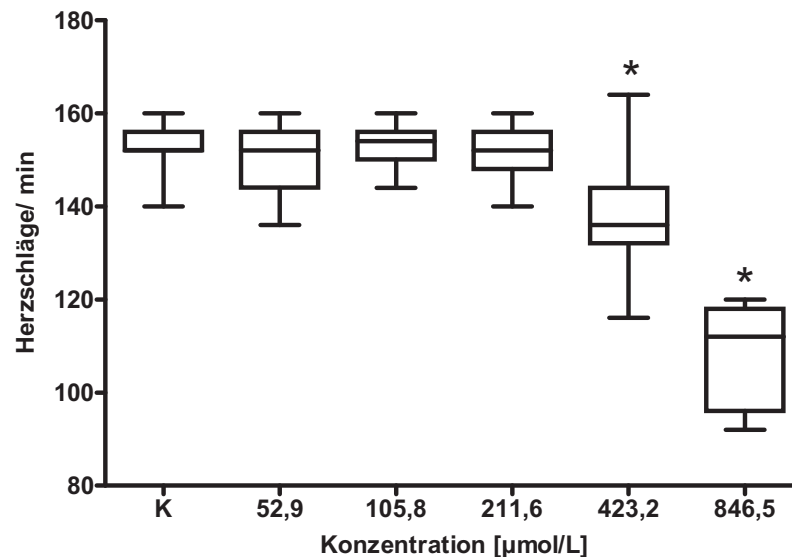


Abbildung 3-26: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Carbamazepin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-62 zusammengestellt.

Tabelle 3-62: Zusammenfassung der berechneten Werte für Carbamazepin (Hb: basierend auf fehlendem Herzschlag).

Effekt	Zeit [h]	[$\mu\text{mol/L}$]
LC_{50} Hb	48	762,0
EC_{50} kein Herzschlag	48	762,0
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	574,9
EC_{50} Ödeme	48	574,9
EC_{50} Pigmentierung	48	488,9
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	211,6
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	423,2

Liebig (2005) untersuchte die Toxizität von Carbamazepin ebenfalls an Embryonen des Zebrafisches in den Konzentrationen 26,5, 53, 106, 212 und 424 $\mu\text{mol/L}$. Es zeigte sich ein verzögerter Schlupf der Embryonen nach 96 Stunden in den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen. Die Herzschlagfrequenz war nach 96 Stunden in der höchsten untersuchten

Konzentration signifikant reduziert. Der Autor gibt eine NOEC von 106 µmol/L sowie eine LOEC von 212 µmol/L an. Andere Effekte waren nicht zu beobachten. Die Ergebnisse bestätigen die, in der vorgestellten Untersuchung gemachten Beobachtungen. Im von Liebig (2005) untersuchten Konzentrationsbereich zeigten sich auch im vorgestellten Test nur wenige Effekte an den exponierten Embryonen. Jedoch sind die berechneten NOEC (211 µmol/L) und LOEC (423 µmol/L) etwas höher, als die von Liebig (2005) ermittelten Werte.

Von den vielfältigen Nebenwirkungen, die in der Literatur beschrieben werden, zeigten sich beim Embryo Ödeme, Bradykardie sowie eine Beeinflussung der Blutbildung. Zudem gibt es klare Hinweise auf Risiken für menschliche Föten. Es sind verschiedene embryonale Fehlbildungen beschrieben worden, einschließlich *spina bifida* und auch andere kongenitale Anomalien wie z.B. kraniofaziale Defekte, kardiovaskuläre Fehlbildungen und Anomalien, bei denen verschiedene Körperteile betroffen waren (Novartis Pharma, 2002; Gerot, 2002). Im vorgestellten Test zeigten sich jedoch nur an einzelnen Embryonen teratogene Effekte.

3.1.4.2 Valproinsäure

Valproinsäure wurde nach mehreren Vorversuchen in den Konzentrationen 43,9 µmol/l, 58,5 µmol/L, 78,0 µmol/L, 104,0 µmol/L sowie 138,7 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 46 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und keine subletalen Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-63 zusammengefasst. Es zeigte sich ab 78 µmol/L eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine LC₅₀ (48h) von 91,5 µmol/L (r^2 : 1,000; b: 14,488; LC₁₀: 74,7 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-63: Zusammenstellung der letalen Effekte von Valproinsäure (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	43,9	58,5	78,0	104,0	138,7
Koagulation	4	-	-	-	-	-	1/20
	8	-	-	-	-	-	1/20
	12	-	-	-	-	-	2/20
	24	-	-	-	-	8/20	20/20
	36	-	-	-	3/20	11/20	20/20
	48	1/20	-	-	4/20	16/20	20/20
gesamt [%]	48	5	-	-	20	80	100

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-64 zusammenfassend dargestellt. Nach 8 Stunden waren in der höchsten untersuchten Konzentration noch zwei Keime im

Stadium der hohen Blastula. Die Schwanzablösung vom Dotter war ab Konzentration 78 $\mu\text{mol/L}$ verzögert. Es zeigten sich nach 24, 36 und auch nach 48 Stunden Deformationen an Somiten, Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule an den exponierten Embryonen. Bis in die niedrigste untersuchte Konzentration zeigte sich eine Beeinflussung der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und der Pigmentierung; auch waren in fast allen Konzentrationen Ödeme zu beobachten. Ab der Konzentration 58,5 $\mu\text{mol/L}$ hatten die Embryonen konzentrationsabhängig keine Otolithen angelegt.

Tabelle 3-64: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Valproinsäure (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	43,9	75,5	78,0	104,0	138,7
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	-	2/19
	12	-	-	-	-	-	-
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	17/20	12/12	koa
	36	-	-	-	2/17	9/9	koa
	48	-	-	-	2/16	4/4	koa
deformierte Somitenanlage	24	-	2/20	20/20	20/20	12/12	koa
	36	-	-	-	-	9/9	koa
	48	-	-	-	-	4/4	koa
keine/ deformierte Augenanlage	24	-	18/20	20/20	20/20	12/12	koa
	36	-	-	12/20	17/17	9/9	koa
	48	-	-	2/20	15/16	4/4	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	6/20	12/12	koa
	36	-	-	6/20	17/17	9/9	koa
	48	-	-	-	10/16	4/4	koa
deformierter Schwanz	24	-	2/20	20/20	20/20	12/12	koa
	36	-	-	3/20	17/17	9/9	koa
	48	-	-	19/20	16/16	4/4	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	1/20	12/12	koa
	36	-	-	-	1/17	9/9	koa
	48	-	2/20	11/20	1/16	4/4	koa
kein Herzschlag	36	-	-	10/20	17/17	9/9	koa
	48	-	-	8/20	16/16	4/4	koa
kein Blutkreislauf	36	1/20	20/20	20/20	17/17	9/9	koa
	48	-	14/20	20/20	16/16	4/4	koa
keine Pigmentierung	48	-	3/20	4/20	16/16	4/4	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	14/20	16/20	-	-	koa
Dotterödem	48	-	10/20	16/20	6/16	-	koa
Perikardödem	48	-	12/20	16/20	11/16	-	koa
gesamt	48	-	15/20	18/20	12/16	-	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	6/20	16/16	4/4	koa

Wie Abbildung 3-27 zu entnehmen ist, zeigte sich bis in die niedrigste untersuchte Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Eine Angabe der NOEC ist daher nicht möglich. Mittels Dunetts-Test wurde eine LOEC von 43,9 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt, die der niedrigsten untersuchten Konzentration entspricht.

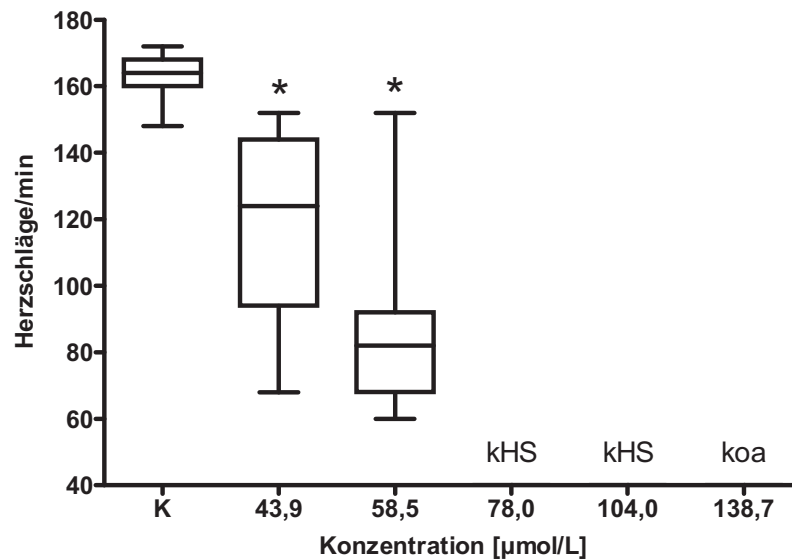


Abbildung 3-27: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Valproinsäure-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-65 zusammengestellt.

Tabelle 3-65: Zusammenfassung der berechneten Werte für Valproinsäure (-: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[$\mu\text{mol/L}$]
LC ₅₀	48	91,5
EC ₅₀ kein Herzschlag	48	59,8
EC ₅₀ kein Blutkreislauf	48	41,3
EC ₅₀ Schwanzablösung	48	86,2
EC ₅₀ Somitendeformation	48	90,1
EC ₅₀ Schwanzdeformation	48	52,9
EC ₅₀ Wirbelsäulendeformation	48	125,8
EC ₅₀ Augendeformation	48	66,7
EC ₅₀ Kopfdeformation	48	75,9
EC ₅₀ Pigmentierung	48	37,7
EC ₅₀ Ödeme	48	81,7
EC ₅₀ Otolithen	48	62,2
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	43,9

Bachmann (2002) gibt in seinen Untersuchungen mit Valproinsäure im *DarT* eine LC₅₀(48h) von 140 $\mu\text{mol/L}$ an, die recht gut mit der im vorgestellten Test ermittelten LC₅₀ von 91,5 $\mu\text{mol/L}$ übereinstimmt. In beiden Versuchen wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen als letale gewertet. Es zeigten sich zudem in seinen Untersuchungen auch ähnliche subletale Effekte in Form eines fehlenden Herz-Kreislaufsystems, Ödemen, einer reduzierten Pigmentierung und teratogenen Effekten in Form von Deformationen der Chorda und des Schwanzes; auch wurden Spaltembryonen und fehlende Otolithen beobachtet.

Ähnliches berichtet auch Herrmann (1993). In seinen Versuchen mit Embryonen des Zebrafisches zeigten sich konzentrationsabhängig Ödeme, fehlender Blutkreislauf, Entwicklungsverzögerungen und Malformationen in Form von Gehirndeformationen, verkürzten und gebogenen Schwänzen sowie Spaltembryonen.

In der Literatur werden eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben, die während der Behandlung mit Valproinsäure auftreten können. Im Embryotest wurden eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems und Ödeme beobachtet. Auch in Tierversuchen mit Ratten, Mäusen, Kaninchen und Affen traten teratogene Effekte in Form von Neuralrohrdefekten sowie Missbildungen des Skelettsystems und des Gesichtsschädels auf (Hendrickx et al., 1988; Sanofi-Synthelabo, 2003; Trotz et al., 1987).

3.1.4.3 Antiepileptika- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden die beiden Antiepileptika Carbamazepin und Valproinsäure als Einzelstoffe untersucht. In den vorgestellten Untersuchungen erwies sich Valproinsäure mit einer LC₅₀(48h) von 91,5 $\mu\text{mol/L}$ als deutlicher toxischer als Carbamazepin. Carbamazepin wurde bis zur Löslichkeitsgrenze untersucht. Im untersuchten Konzentrationsbereich koagulierten

keine exponierten Embryonen. Bezieht man daher den Endpunkt „fehlender Herzschlag“ als letalen Parameter mit in die Auswertung ein, so ergibt sich eine $LC_{50}(48h)$ von $762 \mu\text{mol/L}$.

Wie Abbildung 3-28 zu entnehmen ist, zeigten sich bei beiden Substanzen Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem, die Pigmentierung und die Otolithen, auch konnten Ödeme beobachtet werden. Bei Valproinsäure waren konzentrationsabhängig bei Embryonen keine Otolithen angelegt, wohingegen bei Carbamazepin bei Embryonen drei Otolithen pro Sacculus angelegt waren. Deformationen waren bei Carbamazepin nur bei einzelnen Embryonen zu beobachten, bei Valproinsäure dagegen bei deutlich mehr Embryonen.

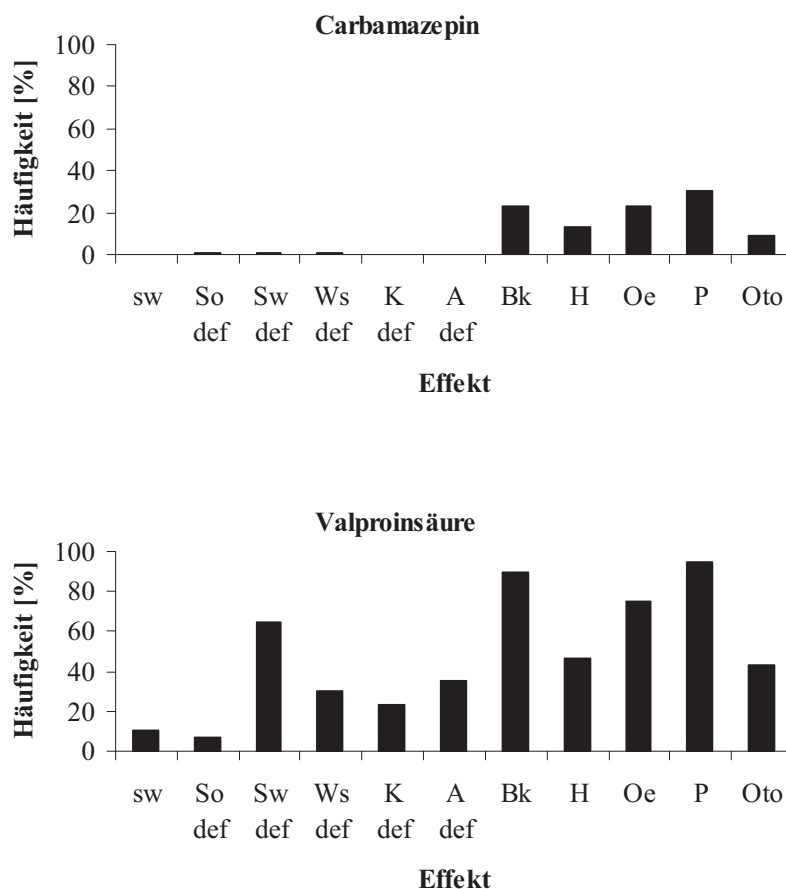


Abbildung 3-28: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Einzelstoffen der Gruppe der Antiepileptika (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

Die antiepileptische Wirkung von Carbamazepin im Säuger ist noch nicht vollständig aufgeklärt, beruht aber wahrscheinlich auf der Bindung der Substanz an spannungabhängige Natrium-Kanäle, deren Inaktivierung nach der Depolarisation verlängert wird. Dadurch stabilisiert die Substanz übererregte Nervenmembranen, hemmt repetitive neuronale Entladungen

und vermindert die synaptische Ausbreitung von exzitatorischen Impulsen (Novartis Pharma, 2002; Gerot, 2002).

Für Valproinsäure werden in der Literatur verschiedene Wirkmechanismen beschrieben. Zum einen soll die Substanz, ähnlich wie Carbamazepin, über spannungsabhängige Natriumkanäle wirken. Zum anderen bindet Valproinsäure an die GABA-Transaminase und inhibiert diese. Daraus resultiert im Gehirn eine erhöhte Konzentration des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA). Es werden auch Enzyme inhibiert, welche die Wiederaufnahme von GABA in die Ganglien und Nervenendigungen blockieren (Wishart, 2006).

Das GABA-System existiert ebenfalls bei Fischen (Fent et al., 2006). Unklar ist jedoch, ob es im Fisch die selbe Funktion erfüllt und ob es bereits im Embryo angelegt ist.

3.1.5 β -Blocker

3.1.5.1 Bisoprolol

Die Substanz wurde in den Konzentrationen 10430,8 $\mu\text{mol/L}$, 13116,1 $\mu\text{mol/L}$, 16492,5 $\mu\text{mol/L}$, 20738,2 $\mu\text{mol/L}$ sowie 26077 $\mu\text{mol/L}$ untersucht.

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 7 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und bei maximal 15,8% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-66 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab der niedrigsten untersuchten Konzentration konzentrations- und zeitabhängig zu. Es wurde eine $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 19134,6 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 0,911; b: 4,954; LC_{10} : 10553,7 $\mu\text{mol/L}$) berechnet.

Tabelle 3-66: Zusammenstellung der letalen Effekte von Bisoprolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	10430,8	13116,1	16492,5	20738,2	26077,0
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
-	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	2/20	2/20	8/20	8/20
	36	-	-	2/20	2/20	8/20	8/20
	48	-	3/20	3/20	7/20	13/20	14/20
gesamt [%]	48	-	15	15	35	65	70

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-67 zusammengestellt. Effekte waren erst nach 48 Stunden zu beobachten. Deformationen an Somiten, Augen und Kopf traten nur bei einzelnen Embryonen auf. Schwanz- und Wirbelsäulendeformationen nahmen ab 13116,1 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 16492,5 $\mu\text{mol/L}$ konzentrationsabhängig zu. Eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme traten bis in die niedrigste untersuchte Konzentration auf. Auch waren bis in die niedrigste untersuchte Konzentration Effekte auf die Otolithen zu beobachten. In den Konzentrationen 10430,8 und 13116,1 $\mu\text{mol/L}$ hatten Embryonen drei Otolithen pro Sacculus angelegt. In den übrigen Konzentrationen waren neben drei bei anderen Embryonen auch keine Otolithen in den Sacculi angelegt. Die Pigmentierung war ab 13116,1 $\mu\text{mol/L}$ konzentrationsabhängig reduziert oder fehlte vollständig.

Tabelle 3-67: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Bisoprolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	10430,8	13116,1	16492,5	20738,2	26077,0
keine oder deformierte Somiten	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	1/17	2/13	-	-
deformierte Augen	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	1/6
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	1/6
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	1/17	4/13	3/7	5/6
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	4/13	3/7	5/6
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	1/17	2/17	3/13	4/7	6/6
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	-
	48	1/19	4/17	9/17	10/13	7/7	6/6
keine Pigmentierung	48	3/19	-	1/17	4/13	4/7	3/6
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	10/17	6/13	3/7	3/6
Dotterödem	48	1/19	4/17	9/17	10/13	7/7	5/6
Perikardödem	48	-	5/17	10/17	10/13	7/7	5/6
gesamt	48	1/19	5/17	10/17	10/13	7/7	5/6
keine/ deformierte Otolithen	48	-	6/17	9/17	7/13	6/7	6/6

Wie Abbildung 3-29 zu entnehmen ist, zeigte sich bis in die niedrigste untersuchte Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz, so dass eine Angabe der NOEC nicht möglich war. Mittels Dunetts Test wurde eine LOEC von 10430,8 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

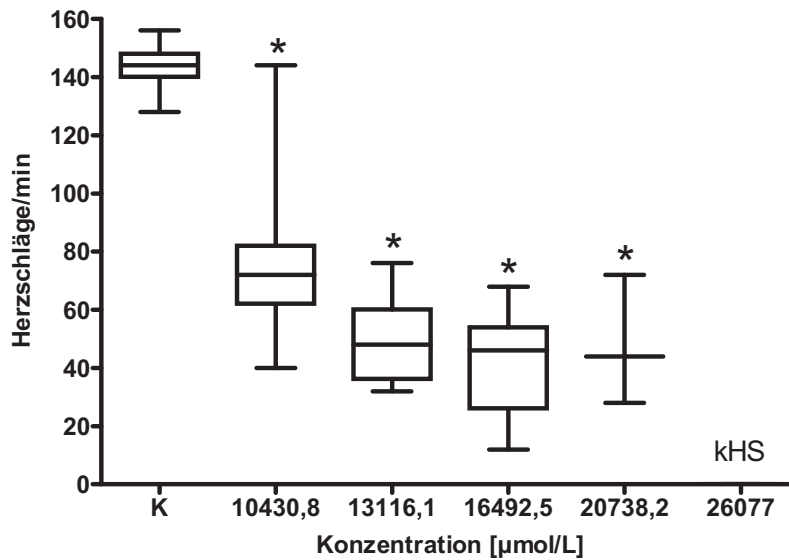


Abbildung 3-29: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Bisoprolol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-68 zusammengestellt.

Tabelle 3-68: Zusammenfassung der berechneten Werte für Bisoprolol (-: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	19134,6
EC_{50} kein Herzschlag	48	19350,3
EC_{50} Blutkreislauf	48	14819,5
EC_{50} Ödeme	48	12698,9
EC_{50} Pigmentierung	48	13429,6
EC_{50} Schwanzdeformation	48	20517,8
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	20628,8
EC_{50} Otolithen	48	13181,9
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	10430,8

Bisoprolol ruft eine Reihe von Nebenwirkungen hervor (Sandoz, 2002, Merck 2002b, 2003b). Im Embryotest sind davon die Beeinträchtigung des Blutkreislaufs, Bradykardie, d.h. ein ungewöhnlich langsamer Puls sowie arrhythmogene Effekte, d.h. ein unregelmäßiger Herzschlag beobachtet worden (subjektiv).

3.1.5.2 Metoprolol

Metoprolol wurde in den Konzentrationen 2190,4 µmol/L, 3285,6 µmol/l, 4928,4 µmol/L, 7392,6 µmol/L sowie 11088,8 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 28 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 5,3% subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-69 zusammengefasst. Letale Effekte traten nur in der höchsten untersuchten Konzentration auf. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 10656,4 µmol/L (r^2 : 0,993; b: 19,453; LC_{10} : 9158,1µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-69: Zusammenstellung der letalen Effekte von Metoprolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	2190,4	3285,6	4928,4	7392,6	11088,8
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	1/20
	12	-	-	-	-	-	2/20
	24	-	-	-	-	-	9/20
	36	1/20	-	-	-	-	10/20
	48	1/20	-	-	-	-	13/20
gesamt [%]	48	5	-	-	-	-	65

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-70 zusammenfassend dargestellt. Nach 12 Stunden zeigten sich bei zwei Embryonen in der höchsten untersuchten Konzentration Deformationen an den Gastrulationsstadien („Hantelsyndrom“). Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Augen und Schwanz waren bei einzelnen Embryonen zu beobachten. Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem und Ödeme zeigten sich nach 48 Stunden ab 3285,6 µmol/L. Die Pigmentierung war bis in die niedrigste untersuchte Konzentration reduziert bzw. fehlte vollständig. Auch konnten bis in die niedrigste untersuchte Konzentration Effekte auf die Otolithen beobachtet werden. Ähnlich wie bei Bisoprolol waren hier drei Otolithen pro Sacculus angelegt.

Tabelle 3-70: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Metoprolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	2190,4	3285,6	4928,4	7392,6	11088,8
deformierte Gastrula	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	2/18
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	-	1/11
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	1/7
keine/ deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	-	1/11
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	1/7
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	1/11
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	4/20	4/7
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	1/20	4/7
kein Blutkreislauf	48	-	-	1/20	2/20	7/20	5/7
keine Pigmentierung	48	-	1/20	7/20	17/20	19/20	7/7
reduzierte Pigmentierung	48	-	9/20	12/20	3/20	1/20	-
Dotterödem	48	1/19	-	1/20	3/20	8/20	3/7
Perikardödem	48	1/19	-	1/20	3/20	7/20	5/7
gesamt	48	1/19	-	1/20	4/20	10/20	5/7
keine/ deformierte Otolithen	48	-	3/20	7/20	4/20	7/20	4/7

Wie Abbildung 3-30 zu entnehmen ist, zeigte sich bis in die niedrigste untersuchte Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz, so dass keine NOEC berechnet werden konnte. Mittels Dunetts-Test wurde eine LOEC von 2190,4 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

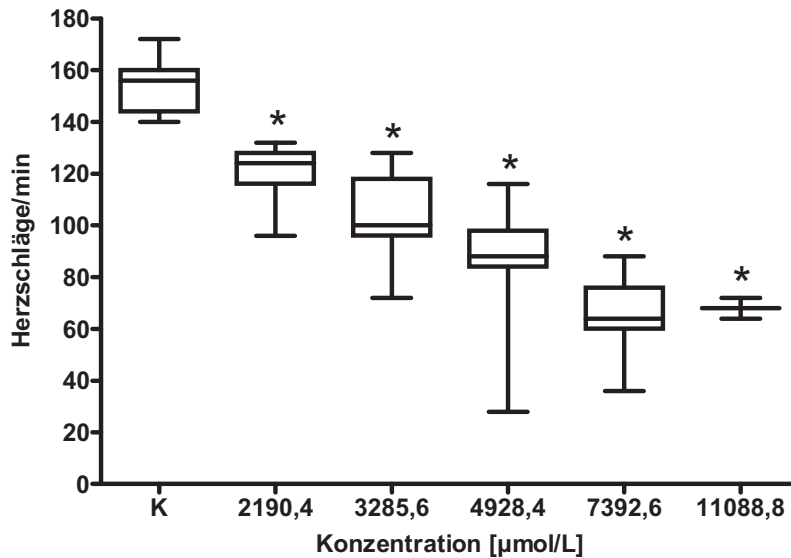


Abbildung 3-30: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Metoprolol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts- Test).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-71 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-71: Zusammenfassung der berechneten Werte für Metoprolol (-: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	10656,4
EC_{50} kein Herzschlag	48	10656,4
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	8690,2
EC_{50} Pigmentierung	48	1781,1
EC_{50} Ödeme	48	9213,3
EC_{50} Schwanzdeformation	48	10324,2
EC_{50} Otolithen	48	10892,5
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	2190,4

Von den vielfältigen in der Literatur beschriebenen Nebenwirkungen (AstraZeneca, 2003, Sankyo, 2004) zeigten sich beim Embryo eine Beeinflussung der Blutbildung, Ödeme, Bradykardie, d.h. ein ungewöhnlich langsamer Puls sowie arrhythmogene Effekte, d.h. ein unregelmäßiger Herzschlag (subjektiv).

3.1.5.3 Propranolol

Propranolol wurde in Anlehnung an Zeller (1995) in den Konzentrationen 125 µmol/L, 250 µmol/L, 500 µmol/L, 1000 µmol/L sowie 2000 µmol/L untersucht. Die Substanz wurde aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und des höheren logK_{ow} der reinen Substanz als Hydrochlorid verwendet.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 36 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und keine subletalen Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-72 zusammengefasst. Ab 250 µmol/L trat eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte auf. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 368,1 µmol/L (r²: 0,996; b: 4,881; LC₁₀: 201,2 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-72: Zusammenstellung der letalen Effekte von Propranolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	125	250	500	1000	2000
Koagulation	4	-	-	-	-	-	3/20
	8	-	-	1/20	-	12/20	19/20
	12	-	-	1/20	-	16/20	20/20
	24	1/20	-	1/20	-	19/20	20/20
	36	1/20	-	1/20	9/20	20/20	20/20
	48	1/20	-	5/20	15/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	5	-	25	75	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-73 zusammenfassend dargestellt. Entwicklungsverzögerungen und Deformationen waren nur bei einzelnen Embryonen zu beobachten. Deutlichere Effekte zeigten sich auf die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und der Pigmentierung. Bis in die niedrigste untersuchte Konzentration zeigte sich hier eine Beeinträchtigung; auch konnten Ödeme beobachtet werden.

Tabelle 3-73: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Propranolol (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	125	250	500	1000	2000
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	1/8	-
	12	-	-	-	-	-	koa
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	1/20	1/1	koa
	36	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	koa	koa
keine/ deformierte Augenanlage	24	-	-	-	1/20	1/1	koa
	36	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	-	1/20	1/1	koa
	36	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	5/11	koa	koa
	48	-	-	1/15	-	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	1/19	7/20	9/15	10/11	koa	koa
	48	-	1/20	3/15	4/5	koa	koa
keine Pigmentierung	48	-	1/20	6/15	4/5	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	3/20	4/15	1/5	koa	koa
Dotterödem	48	-	-	-	3/5	koa	koa
Perikardödem	48	-	1/20	1/15	3/5	koa	koa
gesamt	48	-	1/20	1/15	4/5	koa	koa

Wie Abbildung 3-31 zu entnehmen ist, zeigte sich ab der niedrigsten untersuchten Konzentration eine Reduktion der Herzschlagfrequenz. Ab der Konzentration 250 $\mu\text{mol/L}$ war die Reduktion dann im Vergleich mit den Werten der Kontrolle signifikant. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 125 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 250 $\mu\text{mol/L}$ berechnet.

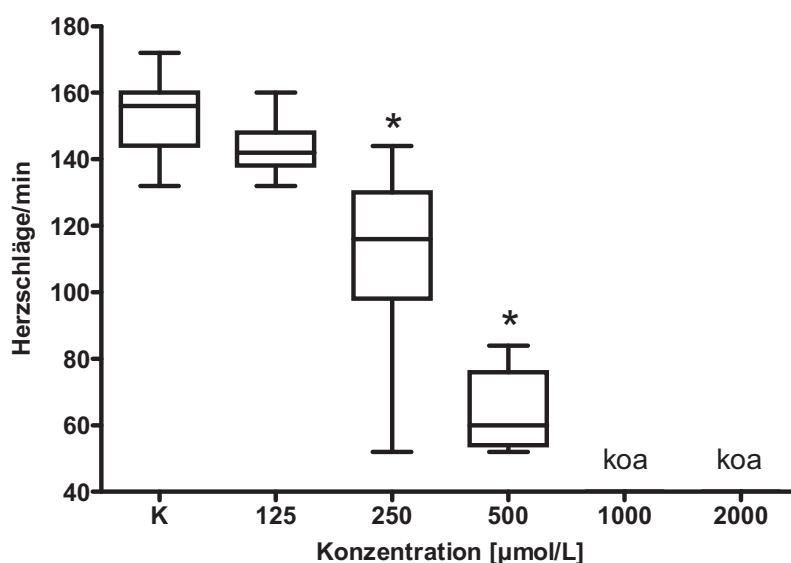


Abbildung 3-31: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Propranolol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-74 zusammengestellt.

Tabelle 3-74: Zusammenfassung der berechneten Werte für Propranolol.

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	368,1
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	352,7
EC_{50} Pigmentierung	48	196,2
EC_{50} Ödeme	48	389,6
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	125
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	250

Zeller (1995) konnte ähnliche Effekte an Embryonen des Zebrafisches während der Propranolol-Exposition beobachten. Auch in ihren Versuchen zeigten sich eine Beeinflussung der Herzschlagfrequenz, der Pigmentierung und des Blutkreislaufs sowie Ödeme.

Neben anderen Nebenwirkungen werden auch für Propranolol eine Beeinflussung der Blutbildung im Knochenmark, Bradykardie und Rhythmusstörungen beschrieben (AstraZeneca, 2002, Helvepharm, 1991), wie sie im vorgestellten Versuch auch beobachtet wurden. In Tierstudien traten zudem unerwünschte Effekte am Fötus auf (Teratogenität, Embryotoxizität, Helvepharm, 1991),

3.1.5.4 β -Blocker- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden die drei β -Blocker Bisoprolol, Metoprolol und Propranolol als Einzelstoffe untersucht. Propranolol war in den vorgestellten Versuchen deutlich toxischer als Metoprolol und Bisoprolol (Tabelle 3-75). Fent et al. (2006) konnten anhand von Literaturdaten ebenfalls zeigen, dass Propranolol die höchste akute Toxizität unter den β -Blockern besitzt. Sie argumentieren, dass möglicherweise die membranstabilisierenden Eigenschaften der Substanz, die andere β -Blocker wie Metoprolol nicht besitzen, dabei eine Rolle spielen könnte.

Tabelle 3-75: Darstellung der anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten LC_{50} -Werte nach 48 Stunden für die drei untersuchten β -Blocker.

$LC_{50}(48h), [\mu\text{mol/L}]$		
Bisoprolol	Metoprolol	Propranolol
19134,6	10656,4	368,1

Es zeigten sich bei allen drei Substanzen Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem und die Pigmentierung sowie Ödeme (Abbildung 3-32). Bei allen drei Stoffen war zudem konzentrationsabhängig eine Reduktion der Herzschlagfrequenz zu beobachten. Während der Exposition gegenüber Bisoprolol und Metoprolol waren außerdem Deformationen sowie Effekte auf die Otolithen zu beobachten, wobei sowohl keine als auch drei Otolithen pro Sacculus aufgetreten sind. Anhand der beobachteten subletalen Effekte lässt sich feststellen, dass während der Exposition gegenüber Bisoprolol die meisten Effekte zu beobachten waren.

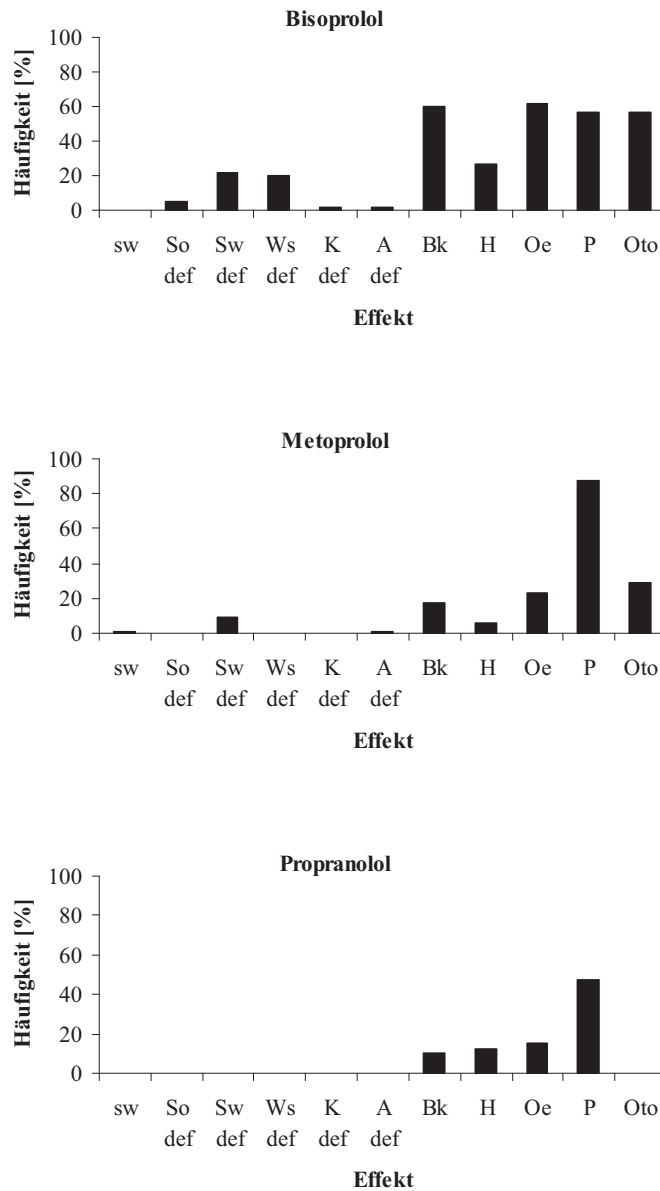


Abbildung 3-32: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Einzelstoffen der Gruppe der β -Blocker (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

Beta-Blocker sind Substanzen, die als kompetitive Inhibitoren der β -Rezeptoren wirken und werden in der Humanmedizin bei der Behandlung von Bluthochdruck und nach Herzinfarkten angewendet. Das adrenerge System ist an einer Reihe von physiologischen Prozessen und Funktionen beteiligt. So spielt es eine Rolle bei der Regulation des Herzschlages und der Vasodilatation der Blutgefäße. Während Bisoprolol und Metoprolol selektive β_1 -

Rezeptoren-Blocker sind, die erst in hohen Konzentrationen auch die β_2 -Rezeptoren blockieren, wird Propranolol als unspezifischer β -Blocker charakterisiert. Alle drei Substanzen wirken als Antagonisten zu den Catecholaminen Adrenalin und Noradrenalin. Der durch Adrenalin und Noradrenalin vermittelte stimulierende Einfluss des Sympathikus auf das Herz wird durch die kompetitive Blockade der β -Rezeptoren ausgeschaltet (Forth et al., 2001; Zeller, 1995). Als pharmakologische Effekte zeigen sich eine Senkung der Herzfrequenz und eine Reduktion der maximalen Kontraktionskraft. Im Embryotest zeigte sich sehr gut der Einfluss der drei Substanzen auf die Herzschlagfrequenz.

Neben der β -Rezeptor-Blockade, zeigt Propranolol zudem membranstabilisierende Eigenschaften, die mit zunehmender Konzentration immer mehr an Bedeutung gewinnen und bei hoher Dosierung für die unspezifischen kardiodepressiven Effekte der Substanz verantwortlich sind. Die membranstabilisierende Wirkung basiert auf der Einlagerung des amphiphilen β -Blockers in die Zellmembran (Zeller, 1995).

β -Adrenorezeptoren sind in Fischen nachgewiesen worden und zeigen eine hohe Homologie zu jenen in Säugern (Fent et al., 2006). Während der Exposition der Embryonen zeigte sich bei allen drei Substanzen eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz, was auf einen ähnlichen Wirkmechanismus in Fisch und Säuger schließen lässt. Es ist jedoch nicht bekannt, ob β -Blocker in Fischen über die gleichen Mechanismen wirken und welche Rolle das β -adrenerge System im Fisch tatsächlich spielt.

3.1.6 β -Sympathomimetika

3.1.6.1 Clenbuterol

Clenbuterol wurde als Clenbuterol-Hydrochlorid in den Konzentrationen 4303,5 $\mu\text{mol/L}$, 6455,2 $\mu\text{mol/L}$, 9682,8 $\mu\text{mol/L}$, 14524,2 $\mu\text{mol/L}$ sowie 21786,4 $\mu\text{mol/L}$ untersucht.

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 12 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen weder letale noch subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-76 zusammengefasst. Bereits ab der niedrigsten untersuchten Konzentration zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte, wobei ab 9682,8 $\mu\text{mol/L}$ innerhalb von 24 Stunden alle eingesetzten Embryonen koaguliert waren. Es wurde eine $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 4746,7 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 1,000; b: 12,319; LC_{10} : 3736,6 $\mu\text{mol/L}$) berechnet.

Tabelle 3-76: Zusammenstellung der letalen Effekte von Clenbuterol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	4303,5	6455,2	9682,8	14524,2	21786,4
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	14/20
	12	-	-	-	1/20	14/20	20/20
	24	-	-	1/20	20/20	20/20	20/20
	36	-	-	7/20	20/20	20/20	20/20
	48	-	6/20	19/20	20/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	30	95	100	100	100

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-77 zusammenfassend dargestellt. In allen Konzentrationen zeigte sich nach 24 Stunden eine zunehmende gelbliche Verfärbung der Embryonen.

In beiden höchsten untersuchten Konzentrationen waren nach 8 Stunden 10% bzw. 100% der nicht-koagulierten Embryonen noch im Stadium der hohen Blastula. Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter und Deformationen an den Somiten traten nur nach 24 Stunden und nur bei einzelnen Embryonen in 6455,2 $\mu\text{mol/L}$ auf. Deformationen an Augen, Kopf und Schwanz waren dagegen bis in die niedrigste untersuchte Konzentration zu beobachten. Auch zeigten sich bis in die niedrigste untersuchte Konzentration Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem, die Pigmentierung und die Otolithen sowie Ödeme.

Tabelle 3-77: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Clenbuterol (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	4303,5	6455,2	9682,8	14524,2	21786,4
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	2/20	6/6
keine Schwanzablösung	24	-	-	3/19	koa	koa	koa
	36	-	-	-	koa	koa	koa
	48	-	-	-	koa	koa	koa
keine oder deformierte Somitenanlage	24	-	-	1/19	koa	koa	koa
	36	-	-	-	koa	koa	koa
	48	-	-	-	koa	koa	koa
deformierte Augenanlage	24	-	-	19/19	koa	koa	koa
	36	-	-	13/13	koa	koa	koa
	48	-	2/14	1/1	koa	koa	koa
deformierter Kopf	24	-	-	13/19	koa	koa	koa
	36	-	-	9/13	koa	koa	koa
	48	-	2/14	1/1	koa	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	16/19	koa	koa	koa
	36	-	19/20	11/13	koa	koa	koa
	48	-	13/14	1/1	koa	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	12/14	13/13	koa	koa	koa
	48	-	13/14	1/1	koa	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	9/20	20/20	13/13	koa	koa	koa
	48	-	14/14	1/1	koa	koa	koa
keine Pigmentierung	48	-	14/14	1/1	koa	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	koa	koa	koa
Dotterödem	48	-	12/14	-	koa	koa	koa
Perikardödem	48	-	14/14	-	koa	koa	koa
gesamt	48	-	14/14	-	koa	koa	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	13/14	1/1	koa	koa	koa

Wie Abbildung 3-33 zu entnehmen ist, zeigte sich zudem bereits ab der niedrigsten untersuchten Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Die Angabe der NOEC ist daher nicht möglich. Mittels Dunetts-Test wurde eine LOEC von 4303,5 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

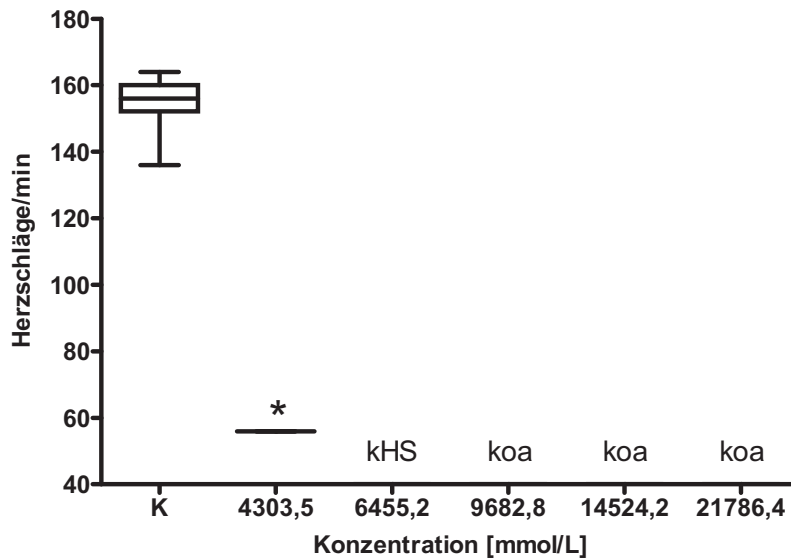


Abbildung 3-33: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clenbuterol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

In einem vorangegangenen Test wurden für Clenbuterol eine NOEC von $478,2 \mu\text{mol/l}$ und eine LOEC von $956,3 \mu\text{mol/L}$ mittels Williams-Test berechnet. Wie Abbildung 3-34 zu entnehmen ist, zeigte sich in den Konzentrationen $59,8$ bis $478,2 \mu\text{mol/L}$ ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der Herzschlagfrequenz; in der Konzentration $956,3 \mu\text{mol/L}$ dagegen eine signifikante Reduktion.

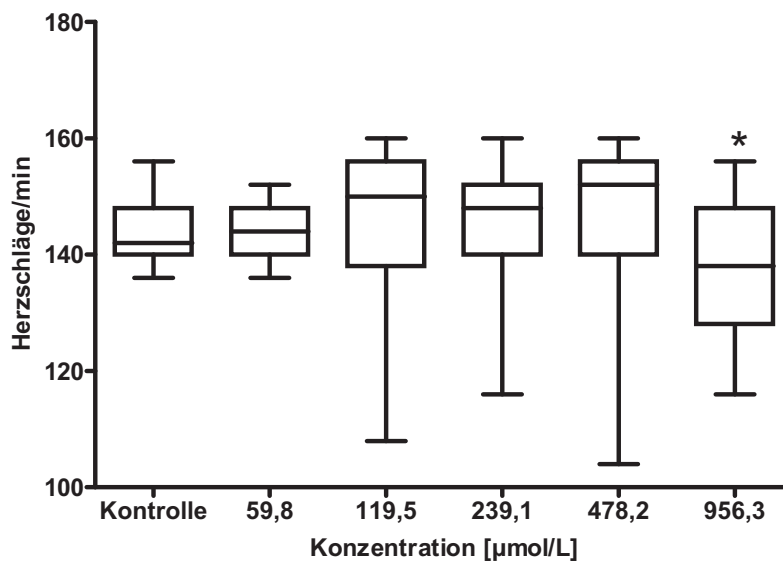


Abbildung 3-34: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clenbuterol-Konzentration im Vorversuch. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-68 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-78: Zusammenfassung der berechneten Werte für Clenbuterol (aE: alle Embryonen bis in die niedrigste untersuchte Konzentration zeigten diesen Effekt; -: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	4746,7
EC_{50} kein Herzschlag	48	2852,5
EC_{50} Blutkreislauf	48	aE
EC_{50} Ödeme	48	-
EC_{50} Pigmentierung	48	aE
EC_{50} Schwanzdeformation	48	-
EC_{50} Augendeformation	48	4775,5
EC_{50} Kopfdeformation	48	4775,5
EC_{50} Otolithen	48	2852,5
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	4303,5

In der Literatur werden für Clenbuterol HCl sowohl Tachykardie, d.h. ein Anstieg der Herzschlagfrequenz als auch Bradykardie, d.h. ein Abfall der Herzschlagfrequenz beschrie-

ben; Effekte, die auch in den vorgestellten Untersuchungen zu beobachten waren. Zudem zeigten sich im Tierversuch konzentrationsabhängig teratogene Effekte in Form von Gaumenspalten und Synostosen, d.h. knöchernen Verbindungen zweier Knochen (EMEA, 2000a). Beim Embryo konnten teratogene Effekte in Form von Deformationen an Schwanz, Augen und Kopf beobachtet werden.

3.1.6.2 Salbutamol

Salbutamol wurde in den Konzentrationen 4335 µmol/L, 8670 µmol/l, 17340 µmol/l, 34680,1 µmol/l sowie 69360,2 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang in Tabelle 39 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und bei maximal 21% der eingesetzten Embryonen subletale Effekt beobachtet werden konnten.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-79 zusammengefasst. Erst ab 34680,1 µmol/L zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 47280,1 µmol/L (r^2 : 1,000; b: 7,699; LC_{10} : 32242,4 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-79: Zusammenstellung der letalen Effekte von Salbutamol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	4335	8670	17340	34680,1	69360,2
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	3/20	18/20
	36	-	-	-	-	3/20	18/20
	48	-	-	-	-	3/20	18/20
gesamt [%]	48	-	-	-	-	15	90

Die während der 48-stündigen Exposition gegenüber Salbutamol beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-80 zusammenfassend dargestellt. Trotz der hohen eingesetzten Konzentrationen zeigten sich nur wenige subletale Effekte. Aufgrund der fehlenden Konzentrationsabhängigkeit konnten keine Effektkonzentrationen berechnet werden.

Tabelle 3-80: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Salbutamol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	4335	8670	17340	34680,1	69360,2
deformierte Wirbelsäule	24	-	3/20	8/20	3/20	4/17	-
	36	-	1/20	-	-	-	-
	48	-	1/20	-	-	-	-
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	-
	48	1/19	-	-	2/20	1/17	1/2
keine Pigmentierung	48	4/19	5/20	7/20	5/20	1/17	-
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	1/20	-	-	-
Dotterödem	48	1/19	-	-	2/20	1/17	1/2
Perikardödem	48	1/19	-	-	2/20	1/17	1/2
gesamt	48	1/19	-	-	2/20	1/17	1/2

Die ermittelten Herzschlagfrequenzen sind in Abbildung 3-35 zusammenfassend dargestellt. Ähnlich dem Versuch mit Clenbuterol zeigte sich in den Konzentrationen 4335-34680,1 $\mu\text{mol/L}$ ein leichter, nicht-signifikanter Anstieg der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. In der höchsten untersuchten Konzentration zeigte sich dagegen eine signifikante Reduktion der Herzschläge je Minute. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 34680,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 69360,2 $\mu\text{mol/L}$ berechnet.

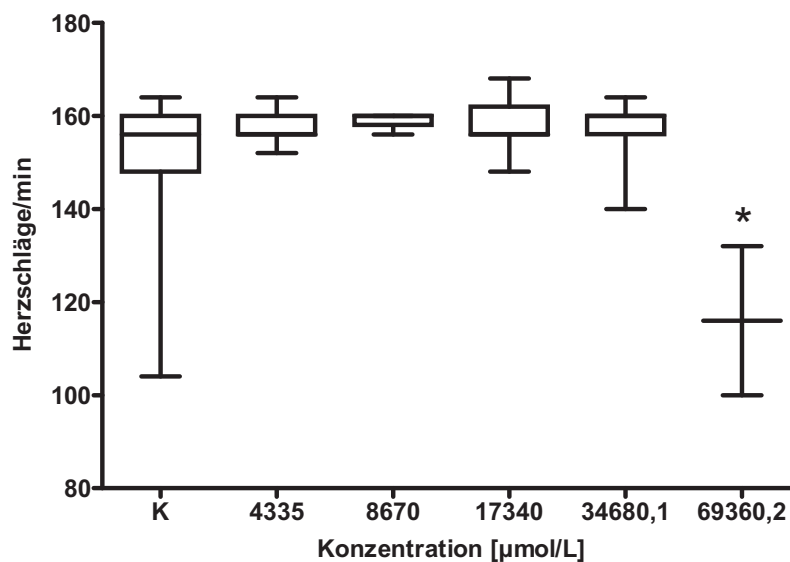


Abbildung 3-35: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Salbutamol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts- Test).

Während der Behandlung mit Salbutamol können eine Reihe von Nebenwirkungen auftreten. Im Embryotest konnten von diesen Effekten Tachykardie (beschleunigter Puls), Herzarrhythmien und Ödeme erfasst werden. Die Substanz wirkte im Tierversuch fetotoxisch auch traten teratogene Effekte an Mäusen und Kaninchen in Form von Gaumenspalten und Schädelmissbildungen auf (GlaxoSmithKline, 2004) Im Embryotest zeigten sich teratogene Effekte in Form von Wirbelsäulendeformationen nach 24, 36 und 48 Stunden. Wobei nach 36 und 48 Stunden nur noch ein Keim Deformationen zeigte.

3.1.6.3 Terbutalin

Die Substanz wurde in den Konzentrationen 44294,6 µmol/L, 50172,3 µmol/L, 56830 µmol/L, 64371,1 µmol/L sowie 72913,9 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 43 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen weder letale noch subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-81 zusammengefasst. Im untersuchten Konzentrationsbereich traten, trotz der hohen eingesetzten Konzentrationen, nur bei maximal 20% der Embryonen letale Effekte auf. Eine Berechnung der LC_x-Werte war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-81: Zusammenstellung der letalen Effekte von Terbutalin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	44294,67	50172,3	56830,0	64371,1	72913,9
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	2/20	-
	12	-	-	-	2/20	2/20	1/20
	24	-	-	-	3/20	4/20	3/20
	36	-	-	-	3/20	4/20	3/20
	48	-	-	-	3/20	4/20	3/20
gesamt [%]	48	-	-	-	15	20	15

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-82 zusammenfassend dargestellt. Auch hier zeigten sich nur wenige Effekte. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-82: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Terbutalin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	44294,6	50172,3	56830,0	64371,1	72913,9
keine Gastrulation	8	1/20	-	-	1/20	1/18	1/20
	12	-	-	-	-	1/18	-
deformierte Augen	24	-	-	-	-	2/17	2/16
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	2/17	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	1/17	-
	48	-	-	-	-	-	-
kein Blutkreislauf	36	13/20	9/20	15/20	15/17	13/16	14/17
	48	-	-	-	-	1/16	3/17
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	-
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	2/17
Dotterödem	48	-	-	-	-	1/16	3/17
Perikardödem	48	-	-	-	-	1/16	3/17
gesamt	48	-	-	-	-	1/16	3/17

Die nach 48 Stunden ermittelten Herzschlagfrequenzen sind in Abbildung 3-36 graphisch dargestellt. Über den gesamten Konzentrationsbereich zeigte sich, ähnlich wie bei Clenbuterol und Salbutamol, ein leichter, nicht-signifikanter Anstieg der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Mittels Dunetts-Test wurde eine NOEC von 72913,9 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt, die der höchsten untersuchten Konzentration entspricht.

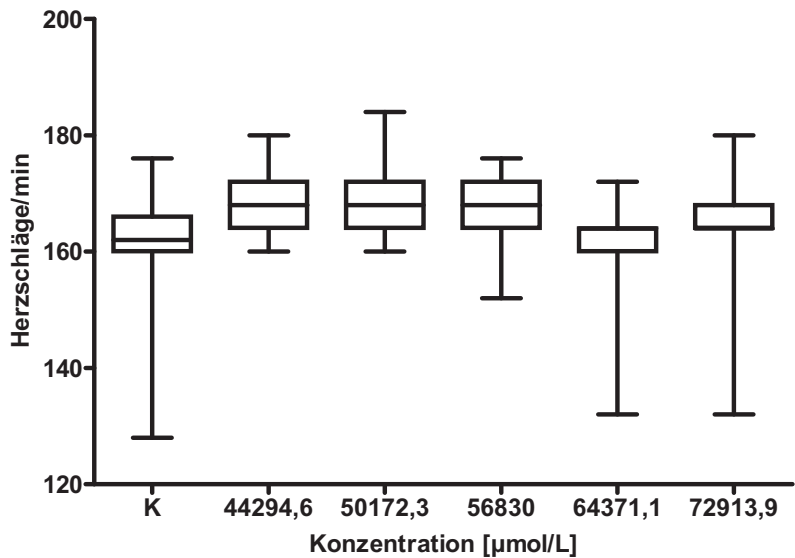


Abbildung 3-36: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Terbutalin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.

In der Literatur werden nur wenige Nebenwirkungen für die Anwendung von Terbutalin beschrieben (AstraZeneca, 1992). Von den beschriebenen Effekten konnten während der Exposition der Embryonen gegenüber der Substanz keine beobachtet werden.

3.1.6.4 β -Sympathomimetika- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden die drei β -Sympathomimetika Clenbuterol, Salbutamol und Terbutalin als Einzelstoffe untersucht. Wie Tabelle 3-83 zu entnehmen ist, erwies sich Clenbuterol als am toxischsten für die Embryonen. Im Versuch mit Terbutalin koagulierten nur wenige Embryonen und zudem nicht konzentrationsabhängig, so dass keine $LC_{50}(48h)$ berechnet werden konnte.

Tabelle 3-83: Darstellung der anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten LC_{50} -Werte nach 48 Stunden für die drei untersuchten β -Sympathomimetika.

	$LC_{50}(48h)$, [$\mu\text{mol/L}$]		
	Clenbuterol	Salbutamol	Terbutalin
	4746,7	47280,1	>72913,9

Betrachtet man die subletalen Effekte, so zeigt sich, dass auch hier Clenbuterol toxischer war als Salbutamol und Terbutalin (Abbildung 3-37). Es zeigten sich bei der Exposition der Embryonen gegenüber Clenbuterol deutlich mehr Effekte als bei den übrigen beiden Substanzen.

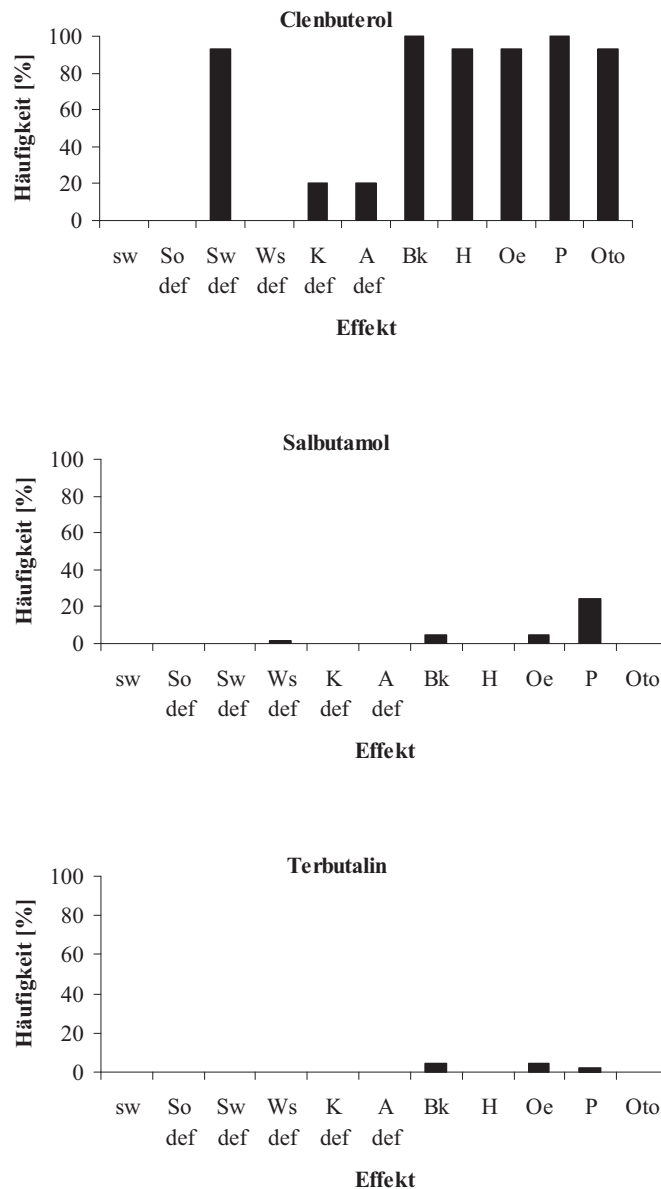


Abbildung 3-37: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den Einzelstoffen der Gruppe der β -Sympathomimetika (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

Jedoch war bei allen drei Substanzen ein leichter, nicht-signifikanter Anstieg der Herzschlagfrequenz in den niedrigeren untersuchten Konzentrationen zu beobachten. Dieser Effekt lässt sich mit dem Wirkmechanismus der drei getesteten Stoffe erklären. Alle drei Substanzen sind β_2 -selektive Sympathomimetika und wirken als solche als β_2 -adrenerge Agonisten zu

Adrenalin und Noradrenalin. Sie üben damit einen stimulierenden Effekt auf Herz, Kreislauf und ZNS aus.

3.1.7 Gemischte Stoffgruppe mit unähnlichen Wirkmechanismen

3.1.7.1 17- α -Ethinylöstradiol (EE₂)

Aufgrund des logK_{ow} der Substanz von 4,2 wurden zwei Versuche durchgeführt. Ein Versuch wurde in der Wellplatte, ein weiterer Versuch in Rollrandgläsern angesetzt. EE₂ wurde in beiden Versuchen in den Konzentrationen 1,9 $\mu\text{mol/L}$, 3,8 $\mu\text{mol/L}$, 7,6 $\mu\text{mol/L}$, 15,2 $\mu\text{mol/L}$ sowie 30,4 $\mu\text{mol/L}$ untersucht.

3.1.7.1.1 Versuch in Wellplatte

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 20 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und nur bei maximal 5,6 % der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-84 zusammengefasst. Ab der Konzentration 7,6 $\mu\text{mol/L}$ zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Bereits nach 24 Stunden waren in den drei höchsten untersuchten Konzentrationen alle eingesetzten Embryonen koaguliert. In den Konzentrationen 1,9 $\mu\text{mol/L}$ und 3,8 $\mu\text{mol/L}$ traten dagegen keine letalen Effekte auf. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 5,4 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 1,000, b: 20,663, LC₁₀: 4,7 $\mu\text{mol/L}$) berechnet.

Tabelle 3-84: Zusammenstellung der letalen Effekte von EE₂ während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	1,9	3,8	7,6	15,2	30,4
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	2/20	11/20	12/22
	12	-	-	-	17/20	20/20	22/22
	24	-	-	-	20/20	20/20	22/22
	36	-	-	-	20/20	20/20	22/22
	48	-	-	-	20/20	20/20	22/22
gesamt [%]	48	-	-	-	100	100	22

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-85 dargestellt. In den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen zeigte sich bereits zum Zeitpunkt des Einsetzens in die Wellplatte eine Entwicklungsverzögerung der vorexponierten Embryonen im Vergleich

zur Kontrolle. Nach 4 Stunden waren in diesen beiden Konzentrationen bei 95% bzw. 100% der eingesetzten Embryonen deformierte hohe Blastulae zu beobachten. Nach 8 bzw. 12 Stunden zeigte ein Großteil der Embryonen in den drei höchsten untersuchten Konzentrationen keine Gastrulation bzw. deformierte Gastrulationsstadien (72%, 78% bzw. 100%). Nur einzelne Embryonen entwickelten sich normal. Nach 24 Stunden waren in diesen Konzentrationen alle eingesetzten Embryonen koaguliert. Deformationen an Augen und Kopf waren nach 24 Stunden bei drei Keimen in 3,8 µmol/L zu beobachten. Auch zeigten sich nur in dieser Konzentration Effekte auf die Pigmentierung. Bis in niedrigste untersuchte Konzentration zeigten sich eine Beeinflussung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme.

Tabelle 3-85: Zusammenstellung der subletalen Effekte von EE₂ während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	1,9	3,8	7,6	15,2	30,4
deformierte hohe Blastula	4	-	-	-	-	19/20	22/22
keine / deformierte Gastrulation	8	-	-	-	13/18	7/9	10/10
	12	-	-	-	-	koa	koa
deformierte Augenanlage	24	-	-	3/20	koa	koa	koa
	36	-	-	-	koa	koa	koa
	48	-	-	-	koa	koa	koa
deformierter Kopf	24	-	-	3/20	koa	koa	koa
	36	-	-	-	koa	koa	koa
	48	-	-	-	koa	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	koa	koa	koa
	48	-	-	2/20	koa	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	9/19	15/19	20/20	koa	koa	koa
	48	-	3/19	13/20	koa	koa	koa
keine Pigmentierung	48	1/18	-	1/20	koa	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	10/20	koa	koa	koa
Dotterödem	48	-	3/19	12/20	koa	koa	koa
Perikardödem	48	-	3/19	13/20	koa	koa	koa
gesamt	48	-	3/19	13/20	koa	koa	koa

Wie Abbildung 3-38 zu entnehmen ist, zeigte sich zudem ab der Konzentration 3,8 µmol/L eine signifikante Beeinflussung der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 1,9 µmol/L sowie eine LOEC von 3,8 µmol/L ermittelt.

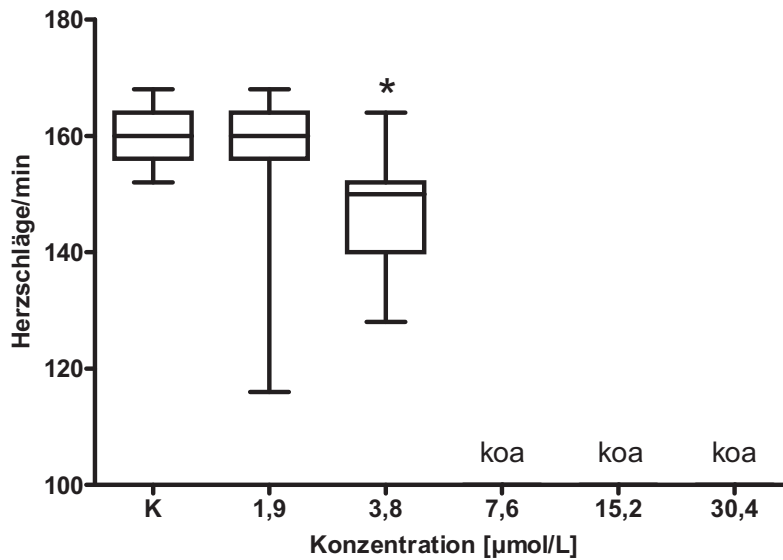


Abbildung 3-38: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der EE₂-Konzentration beim Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC₅₀, EC₅₀ sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-86 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-86: Zusammenfassung der berechneten Werte für EE₂ für den Versuch in der Wellplatte.

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC ₅₀	48	5,4
kein Herzschlag	48	4,7
kein Blutkreislauf	48	3,1
Ödeme	48	3,1
Pigmentierung	48	3,8
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	1,9
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	3,8

3.1.7.1.2 Versuch im Rollrandglas

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 21 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und bei maximal 20% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-87 zusammengefasst. Ähnlich wie in dem Versuch in der Wellplatte zeigte sich ab der Konzentration 7,6 $\mu\text{mol/L}$ eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Bereits nach 24 Stunden waren in den drei höchsten untersuchten Konzentrationen alle eingesetzten Embryonen koaguliert. In 1,9 $\mu\text{mol/L}$ und 3,8 $\mu\text{mol/L}$ traten dagegen keine letalen Effekte auf. Es wurde eine $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 5,4 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 1,000; b: 20,663; LC_{10} : 4,7 $\mu\text{mol/L}$) berechnet.

Tabelle 3-87: Zusammenstellung der letalen Effekte von EE_2 während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	1,9	3,8	7,6	15,2	30,4
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	10/10	10/10	10/10
	48	-	-	-	10/10	10/10	10/10
gesamt [%]	48	-	-	-	100	100	100

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-88 zusammenfassend dargestellt. Im Gegensatz zur Exposition der Embryonen in den Wellplatten zeigten sich bei der Exposition im Rollrandglas weniger subletale Effekte. Lediglich 20% der exponierten Embryonen in der Konzentration 3,8 $\mu\text{mol/L}$ hatten nach 48 Stunden keinen Blutkreislauf ausgebildet und zeigten Ödeme. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Es zeigte sich jedoch der vorzeitige Schlupf der Embryonen nach 48 Stunden. Die Ursache für diesen Effekt, der häufig bei der Exposition der Embryonen in Glas zu beobachten ist, ist unklar.

Tabelle 3-88: Zusammenstellung der subletalen Effekte von EE₂ während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	1,9	3,8	7,6	15,2	30,4
kein Blutkreislauf	48	2/10	-	2/10	koa	koa	koa
Dotterödem	48	-	-	1/10	koa	koa	koa
Perikardödem	48	1/10	-	2/10	koa	koa	koa
gesamt	48	1/10	-	2/10	koa	koa	koa
Schlupf	48	8/10	9/10	8/10	koa	koa	koa

Anhand der in Abbildung 3-39 dargestellten Herzschlagfrequenzen wurden mittels Dunetts-Test eine NOEC von 3,8 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 7,6 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

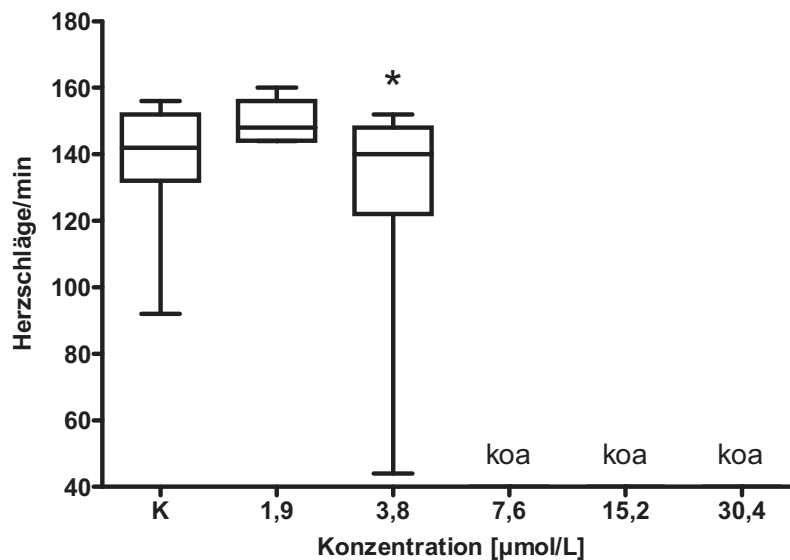


Abbildung 3-39: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der EE₂-Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum(*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

In beiden durchgeführten Versuchen wurde eine LC₅₀(48h) von 5,4 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt. Es zeigten sich jedoch Unterschiede bei den subletalen Effekten. Während bei der Exposition im Glas nur bei maximal 20% der eingesetzten Embryonen Effekte auf die Entwicklung des Blutkreislaufsystems und Ödeme zu beobachten waren, zeigten sich während der Exposition in der Wellplatte deutlichere Effekte. Zudem war eine Beeinflussung der Entwicklung der Pigmentierung und des Herzschlages zu beobachten. Auch bei der Beeinflussung der Herzschlagfrequenz ergaben sich Unterschiede. Bei der Exposition in der Wellplatte war die

Herzschlagfrequenz ab 3,8 $\mu\text{mol/L}$ signifikant reduziert, bei der Exposition im Glas ab 7,6 $\mu\text{mol/L}$.

Damstra et al. (2002) berichten von Ödemen, Blutleere, Kopfdeformationen und Mortalität der frühen Lebensstadien bei der Exposition von Salmoniden gegenüber verschiedenen endokrinen Disruptoren. Auch in den vorgestellten Untersuchungen zeigten sich bereits nach einer Stunde Effekte an den exponierten Embryonen; nach achtstündiger Exposition die Koagulation der Embryonen sowie eine Beeinflussung des Blutkreislaufsystems und Ödeme nach 36 bzw. 48 Stunden. Deformationen konnten dagegen nur vereinzelt beobachtet werden.

Versonnen & Janssen (2004) exponierten adulte und juvenile Zebraabärblinge sowie Embryonen gegenüber EE_2 bis zu einer Konzentration von 0,003 $\mu\text{mol/L}$. Im untersuchten Konzentrationsbereich zeigten sich an den exponierten Embryonen keine signifikanten letalen und subletalen Effekte. Es konnte lediglich ein verzögerter Schlupf nach 120h in den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen festgestellt werden.

Bei der Anwendung von EE_2 in oralen Kontrazeptiva können eine Reihe von Nebenwirkungen auftreten (Grünenthal, 2003). Mit dem Embryotest konnten von diesen Effekten Pigmentierungsstörungen beobachtet werden.

3.1.7.2 Tamoxifen

Aufgrund des $\log K_{ow}$ der Substanz von 6,3 wurden auch bei Tamoxifen zwei Versuche durchgeführt. Ein Versuch wurde in der Wellplatte, ein weiterer Versuch in Rollrandgläsern angesetzt. Tamoxifen wurde als Tamoxifen-citrat in den Konzentrationen 5,5 $\mu\text{mol/L}$, 11,1 $\mu\text{mol/L}$, 22,2 $\mu\text{mol/L}$, 44,3 $\mu\text{mol/L}$ sowie 88,7 $\mu\text{mol/L}$ untersucht.

3.1.7.2.1 Versuch in der Wellplatte

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 42 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% letale und bei 10,5% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-89 zusammengefasst. Erst ab der Konzentration 44,3 $\mu\text{mol/L}$ zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der letalen Effekte. In der höchsten untersuchten Konzentration koagulierten alle eingesetzten Embryonen innerhalb von vier Stunden. Es wurde eine $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 56,8 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 1,000; b: 18,825; LC_{10} : 43,4 $\mu\text{mol/L}$) berechnet.

Tabelle 3-89: Zusammenstellung der letalen Effekte von Tamoxifen während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	5,5	11,1	22,2	44,3	88,7
Koagulation	4	-	-	-	-	-	20/20
	8	-	-	-	-	-	20/20
	12	-	-	-	-	-	20/20
	24	-	-	-	-	2/20	20/20
	36	-	-	-	-	2/20	20/20
	48	1/20	-	-	-	3/20	20/20
gesamt [%]	48	5	-	-	-	15	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-90 zusammenfassend dargestellt. Es zeigte sich ab der niedrigsten untersuchten Konzentration über den gesamten Versuchszeitraum eine zunehmende gelbliche Verfärbung der exponierten Embryonen.

Bis in die niedrigste untersuchte Konzentration zeigte sich eine verzögerte Gastrulation nach 8 Stunden, bei maximal 21% der eingesetzten Embryonen. Vereinzelt zeigten sich fehlende Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Augen und Kopf. Deformationen an Schwanz und Wirbelsäule traten nach 48 Stunden bei 77% bzw. 65% der Embryonen in 44,3 $\mu\text{mol/L}$ auf. Eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme zeigten sich konzentrationsabhängig ab der niedrigsten untersuchten Konzentration. Die Pigmentierung war ab 11,1 $\mu\text{mol/L}$ konzentrationsabhängig beeinträchtigt. Es waren im gesamten Konzentrationsbereich bei Embryonen drei Otolithen pro Sacculus angelegt.

Tabelle 3-90: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Tamoxifen während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	5,5	11,1	22,2	44,3	88,7
keine Gastrulation	8	-	3/20	4/19	4/20	3/20	koa
	12	-	-	-	-	-	koa
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	1/18	koa
	36	-	-	-	-	1/18	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
keine/ deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	1/18	koa
	36	-	-	-	-	1/18	koa
	48	-	-	-	-	-	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	1/20	1/18	koa
	36	-	-	-	1/20	1/18	koa
	48	-	-	-	1/20	2/17	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	-	1/20	1/18	koa
	36	-	-	-	1/20	1/18	koa
	48	-	-	-	1/20	13/17	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	1/18	koa
	36	-	-	-	-	1/18	koa
	48	-	-	-	-	11/17	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	koa
	48	-	-	-	1/20	10/17	koa
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	koa
	48	-	1/20	2/19	4/20	14/17	koa
keine Pigmentierung	48	2/19	-	-	1/20	1/17	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	1/19	3/20	12/17	koa
Dotterödem	48	-	1/20	1/19	3/20	11/17	koa
Perikardödem	48	-	1/20	-	3/20	11/17	koa
gesamt	48	-	1/20	1/19	3/20	11/17	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	4/20	2/19	11/20	7/17	koa

Wie Abbildung 3-40 zu entnehmen ist, zeigte sich bereits ab der niedrigsten untersuchten Konzentration von 5,5 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Beeinflussung der Herzschlagfrequenz. Eine Angabe der NOEC ist daher nicht möglich. Es wurde mittels Dunetts Test eine LOEC von 5,5 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

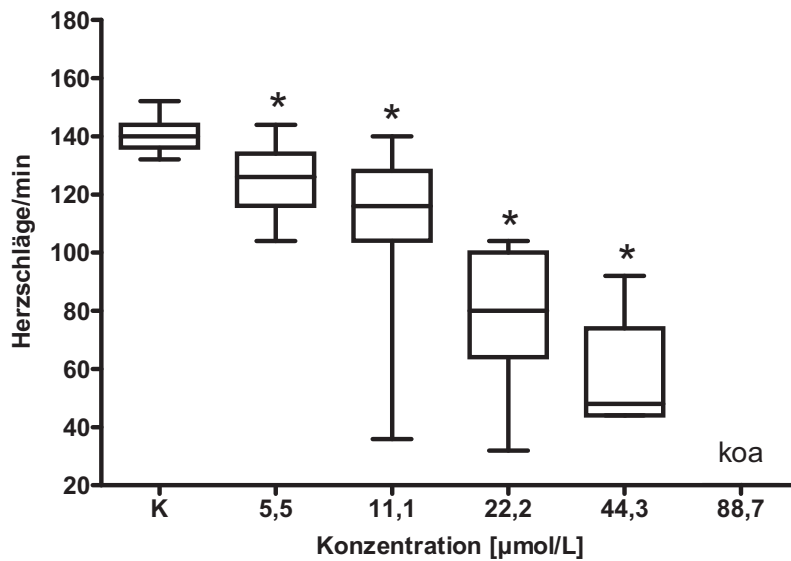


Abbildung 3-40: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Tamoxifen-Konzentration beim Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-91 zusammengestellt.

Tabelle 3-91: Zusammenfassung der berechneten Werte für Tamoxifen beim Versuch in der Wellplatte (-: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	56,8
EC_{50} kein Herzschlag	48	40,8
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	30,7
EC_{50} Ödeme	48	36,8
EC_{50} Pigmentierung	48	35,1
EC_{50} Schwanzdeformation	48	35,9
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	38,9
EC_{50} Otolithen	48	47,4
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	5,5

3.1.7.2.2 Versuch im Rollrandglas

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen vor Testbeginn in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 41 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und nur bei maximal 10,5% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-92 zusammengefasst. Auch in diesem Versuche zeigte sich erst ab der Konzentration 44,3 $\mu\text{mol/L}$ eine konzentrationsabhängige Zunahme der letalen Effekte. In der höchsten untersuchten Konzentration koagulierten alle eingesetzten Embryonen innerhalb von 24 Stunden. Es wurde eine $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 56,7 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 1,000; b: 18,824; LC_{10} : 43,4 $\mu\text{mol/L}$) berechnet.

Tabelle 3-92: Zusammenstellung der letalen Effekte von Tamoxifen während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	5,5	11,1	22,2	44,3	88,7
Koagulation	4	-	-	-	-	-	9/10
	24	-	-	-	-	1/9	10/10
	48	-	-	-	-	2/9	10/10
gesamt [%]	48	-	-	-	-	10,5	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-93 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich vereinzelt Effekte auf die Somiten, die Otolithen sowie Deformationen am Kopf. Schwanzdeformationen waren nach 48 Stunden konzentrationsabhängig ab der niedrigsten untersuchten Konzentration zu beobachten. Das Herz-Kreislaufsystem war ebenfalls bis in die niedrigste untersuchte Konzentration beeinträchtigt; auch waren bis in die niedrigste untersuchte Konzentration Ödeme zu beobachten. Die Entwicklung der Pigmentierung war ab 11,1 $\mu\text{mol/L}$ konzentrationsabhängig beeinträchtigt. Es zeigte sich zudem der verfrühte Schlupf der Embryonen nach 48 Stunden.

Tabelle 3-93: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Tamoxifen während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	5,5	11,1	22,2	44,3	88,7
keine oder deformierte Somiten	24	-	-	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	2/7	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	koa
	48	-	-	1/10	-	-	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	koa
	48	-	1/10	5/10	5/9	6/7	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	koa
	48	1/19	-	-	-	-	koa
kein Herzschlag	48	-	-	1/10	-	1/7	koa
kein Blutkreislauf	48	-	1/10	2/10	1/9	3/7	koa
keine Pigmentierung	48	2/19	-	-	-	-	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	1/10	3/9	7/7	koa
Dotterödem	48	-	1/10	1/10	2/9	5/7	koa
Perikardödem	48	-	1/10	1/10	2/9	5/7	koa
gesamt	48	-	1/10	1/10	2/9	5/7	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	1/10	-	1/7	koa
Schlupf	48	13,5/19	7/10	6,5/10	8,5/9	5,5/7	koa

Wie Abbildung 3-41 zu entnehmen ist, zeigte sich bis in die niedrigste untersuchte Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Die Angabe einer NOEC ist daher nicht möglich. Mittels Dunetts-Test wurde eine LOEC von 5,5 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

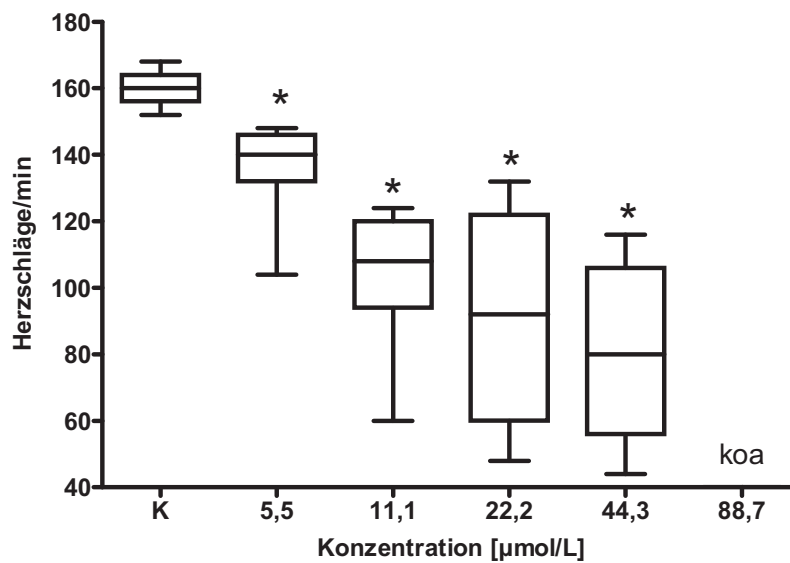


Abbildung 3-41: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Tamoxifen-Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Median, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts- Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-94 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-94: Zusammenfassung der berechneten Werte für Tamoxifen beim Versuch im Rollrandglas (-: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	56,7
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	46,2
EC_{50} Ödeme	48	32,5
EC_{50} Pigmentierung	48	24,7
EC_{50} Schwanzdeformation	48	15,1
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	5,5

Vergleicht man die beiden durchgeführten Versuche, so zeigten sich in beiden Tests ähnliche letale und subletale Effekte (Tabelle 3-95). Es ist davon auszugehen, dass die Wahl des Testmaterials die Ergebnisse nicht beeinflusst hat.

Tabelle 3-95: Darstellung der ermittelten LC₅₀-, EC₅₀- und LOEC-Werte nach 48Stunden. Die Angaben sind in µmol/L.

	Test in der Wellplatte	Test im Rollrandglas
LC ₅₀ (48h)	56,8	56,7
EC ₅₀ (48h)kein Herzschlag	40,8	-
EC ₅₀ (48h)kein Blutkreislauf	30,7	46,2
EC ₅₀ (48h)Ödeme	36,8	32,5
EC ₅₀ (48h)Schwanzdeformation	35,9	15,1
EC ₅₀ (48h)Wirbelsäulendeformation	38,9	-
EC ₅₀ (48h)Pigmentierung	35,1	24,7
EC ₅₀ (48h)Otolithen	47,4	-
LOEC(Herzschlagfrequenz)	5,5	5,5

Hooker et al. (2003) geben für *Pimephales promelas* eine LC₅₀(48h) von 2,9 µmol/L an. Der Embryo hat damit deutlich unsensitiver auf Tamoxifen reagiert.

Tamoxifen kann bei der Anwendung eine Reihe von Nebenwirkungen hervorrufen (Bristol- Myers Squibb, 2003). Als einziger Effekt konnte im Embryotest eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems erfasst werden.

3.1.7.3 Verapamil

Verapamil wurde in Anlehnung an Zeller (1995) in den Konzentrationen 237,0 µmol/L, 355,5 µmol/L, 533,3 µmol/L, 799,9 µmol/l sowie 1199,8 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 47 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 10,5 % subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-96 zusammengefasst. Ab der Konzentration 533,3 µmol/L zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 585 µmol/L (r^2 : 1,000; b: 11,954; LC₁₀: 457,1 µmol/L) ermittelt.

Tabelle 3-96: Zusammenstellung der letalen Effekte von Verapamil (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	237,0	355,5	533,3	799,9	1199,8
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	1/20	-	-	-	-	-
	12	1/20	-	-	-	-	-
	24	1/20	1/20	-	2/20	-	14/20
	36	1/20	1/20	-	2/20	3/20	19/20
	48	1/20	1/20	-	7/20	19/20	20/20
gesamt [%]	48	5	5	-	35	95	100

Die während der 48-stündigen Exposition gegenüber Verapamil beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-97 zusammengefasst. In der höchsten untersuchten Konzentration hatten nach 24 Stunden 67% der nicht-koagulierten Embryonen den Schwanz nicht vom Dotter abgelöst, 83% zeigten Deformationen der Augenanlage und 50% Deformationen des Kopfes. Deformationen an Schwanz und Wirbelsäule wurden ab 355,5 bzw. 533,3 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet. Beeinträchtigungen der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme traten bis in die niedrigste untersuchte Konzentration auf. Die Pigmentierung war ab 355,5 $\mu\text{mol/L}$ reduziert oder fehlte konzentrationsabhängig. Nach 48 Stunden fehlten je einem Keim in 533,3 und 799,9 $\mu\text{mol/L}$ die Otolithen.

Tabelle 3-97: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Verapamil (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	237,0	355,5	533,3	799,9	1199,8
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	-	4/6
keine/ deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	-	5/6
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	3/6
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	1/13	-	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	1/21	13/18	19/20	6/6
	36	1/19	-	6/21	17/18	17/17	1/1
	48	-	-	6/21	13/13	1/1	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	4/6
	36	1/19	-	-	12/18	13/17	1/1
	48	-	-	-	12/13	1/1	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	18/18	17/17	1/1
	48	-	6/19	20/21	13/13	1/1	koa
kein Blutkreislauf	36	7/19	19/19	21/21	18/18	17/17	1/1
	48	-	18/19	21/21	13/13	1/1	koa
keine Pigmentierung	48	2/19	-	-	1/13	1/1	koa
reduzierte Pigmentierung	48	1/19	-	1/21	10/13	-	koa
Dotterödem	48	1/19	12/19	16/21	11/13	1/1	koa
Perikardödem	48	-	14/19	17/21	12/13	1/1	koa
gesamt	48	1/19	16/19	17/21	12/13	1/1	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	1/13	1/1	koa

Wie Abbildung 3-42 zu entnehmen ist, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz bis in die niedrigste untersuchte Konzentration. Eine Angabe der NOEC ist daher nicht möglich. Mittels Dunetts Test wurde eine LOEC von 237,0 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

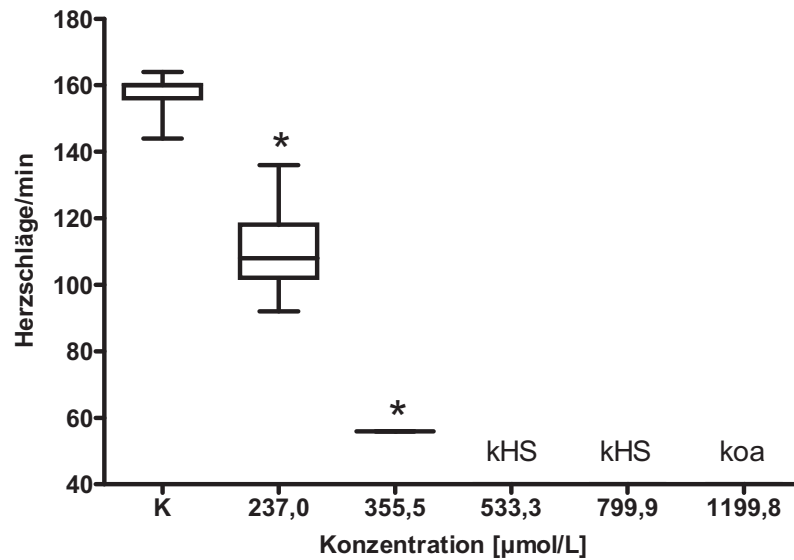


Abbildung 3-42: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Verapamil-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

In einem Vorversuch wurde mittels Dunetts Test für Verapamil eine NOEC von 100 µmol/L ermittelt. Wie Abbildung 3-43 zu entnehmen ist, zeigte sich in den Konzentrationen 50 und 100 µmol/L ein leichter, nicht signifikanter Anstieg, ab 200 µmol/L ein signifikanter Abfall der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle.

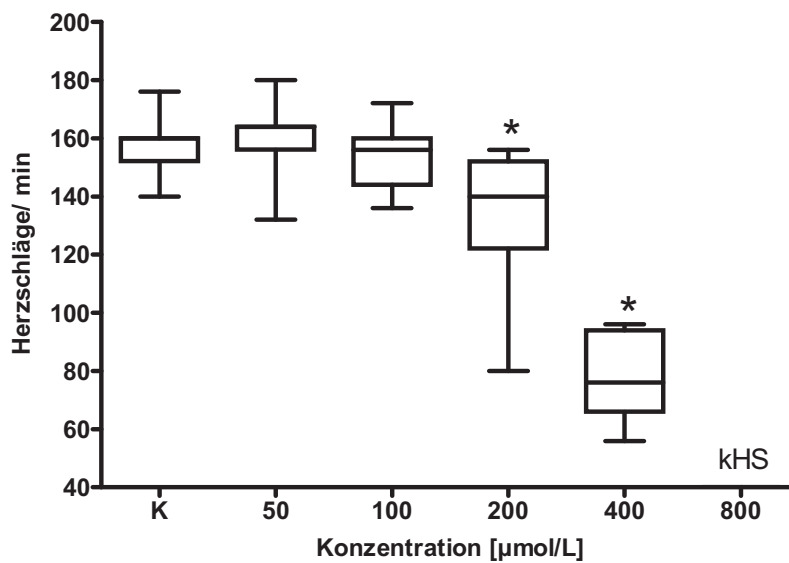


Abbildung 3-43: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Verapamil-Konzentration im Vorversuch. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-98 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-98: Zusammenfassung der berechneten Werte für Verapamil (-: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	585,0
EC_{50} kein Herzschlag	48	251,5
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	149,3
EC_{50} Ödeme	48	69,0
EC_{50} Pigmentierung	48	486,5
EC_{50} Schwanzdeformation	48	378,5
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	496,2
EC_{50} Otolithen	48	606,1
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	237,0

Zeller (1995) gibt eine $LC_{50}(48h)$ von 429 µmol/L an, wobei diese sowohl auf Basis koagulierter als auch Embryonen ohne Herzschlag ermittelt wurde. Die im vorgestellten Versuch ermittelte $LC_{50}(48h)$ von 584,95 µmol/l stimmt mit diesem Wert recht gut überein. Zudem beschreibt Zeller (1995) ähnliche subletale Effekte. Auch in ihren Untersuchungen zeigten sich Beeinträchtigungen bei der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems, der Pigmen-

tierung oder der Otolithen. Ebenfalls traten Ödeme sowie eine verzögerte Entwicklung von Kopf-, Schwanz- und Somitenanlage, einhergehend mit Deformationen auf. Zeller (1995) beschreibt zudem ein vermindertes Längenwachstum der exponierten Embryonen, das den beobachteten Verkürzungen der Schwänze im vorgestellten Versuch entspricht. Die von Zeller (1995) beschriebenen Verfärbungen der Embryonen konnten ab dem Zeitpunkt nach 24 Stunden bereits ab der niedrigsten untersuchten Konzentration beobachtet werden.

Von den vielfältigen in der Literatur beschriebenen Nebenwirkungen bei der Einnahme von Verapamil HCl (Streuli, 1998), konnte im Embryotest nur die Bradykardie (Verlangsamung der Herzschlagfrequenz) erfasst werden.

3.1.7.4 Gemischte Stoffgruppe - zusammenfassende Betrachtung

Es wurden 17- α -Ethinylöstradiol, Tamoxifen und Verapamil als Einzelstoffe untersucht. Es zeigte sich, dass EE2 toxischer auf die Embryonen gewirkt hat als Tamoxifen. Dieses wiederum war toxischer als Verapamil (Tabelle 3-99).

Tabelle 3-99: Darstellung der ermittelten letalen Konzentrationen nach 48 Stunden.

17- α -Ethinylöstradiol	LC ₅₀ (48h), [μ mol/L]	
	Tamoxifen	Verapamil
5,4	56,8	585

Subletal wurden ähnliche Effekt durch alle drei Substanzen hervorgerufen, jedoch in unterschiedlicher Effektstärke (Abbildung 3-44). Alle drei Stoffe zeigten Effekte auf das Herzkreislaufsystem und die Pigmentierung, auch waren Ödeme zu beobachten. Bei der Exposition der Embryonen gegenüber Tamoxifen und Verapamil traten außerdem Deformationen auf. Ein Effekt, der in dieser Gruppe ausschließlich bei Tamoxifen zu beobachten war, waren drei Otolithen pro Sacculus.

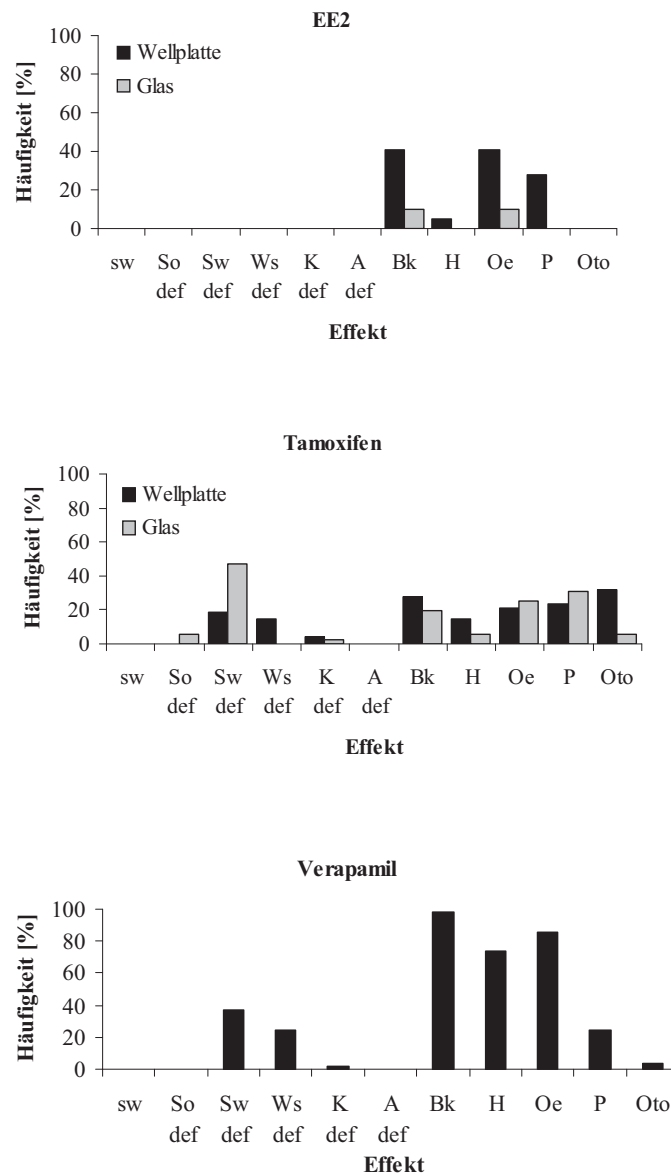


Abbildung 3-44: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den drei Einzelstoffen der Gruppe mit unähnlichen Wirkmechanismen (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

In der Literatur werden für die drei Substanzen verschiedene Wirkmechanismen beschrieben. EE₂ entfaltet neben der sexualspezifischen, östrogenen Wirkung, die mit dem Embryotest nicht erfasst werden kann, auch eine sexualunspezifische. So besitzt die Substanz proteinanabole Eigenschaften und fördert die Resorption und den Einbau von Calcium in die Knochen. Es kommt zur Wasserretention, Dilatation der kleinen Blutgefäße sowie zur Zunahme des Melaningehaltes und zur Förderung der Knochenreifung (Forth et al., 2001).

Für Tamoxifen werden in der Literatur eine Reihe von Wirkmechanismen beschrieben. Die Substanz ist zum einen ein zytostatisches, anti-östrogenes Hormon mit partiellen östrogen-agonistischen Effekten. Sie besitzt daneben antioxidative, antivirale und antibakterielle Eigenschaften sowie membranmodulierende und intrazelluläre Botensysteme verändernde Aktivitäten (Klaau, 2004). Zum anderen inhibiert Tamoxifen die Proteinkinase C, die für die Signalübertragung von der Zelloberfläche ins Zellinnere verantwortlich ist. Über die Hemmung von Calcium-Calmodulin-abhängigen cAMP-Phosphodiesterasen vermindert die Substanz zudem deren zellproliferative Wirkung. Außerdem Tamoxifen eine Rolle bei der Induktion der Apoptose zugeschrieben (Forth et al., 2001; Klaau, 2004).

Verapamil ist ein Calciumantagonist bzw. Calciumkanal-Blocker, der den transmembranalen Calciumeinstrom in die Zelle blockiert, welcher über den L-Typ Calciumkanal erfolgt. Dieser Kanaltyp dominiert in der Zellmembran von Muskelzellen, so bei glatten Gefäßmuskelzellen und auch bei den Herzmuskelzellen (Forth et al., 2001). Die blockierende Wirkung der Substanz beruht auf der Bindung an eine spezifische intrazelluläre Region des Kanalproteins. Dadurch wird der Kanal versperrt und der Calciumeinstrom in die Zelle inhibiert (Schwartz, 1994 zitiert nach Zeller, 1995). Im Herz resultiert daraus bei den Zellen des Sinus- und AV-Knotens eine Abnahme der Aktionspotentialfrequenz, da in diesen die Depolarisationsphase eines Aktionspotentials durch den Einstrom von Calciumionen getragen wird. Der Zusammenhang zwischen der Herzfrequenz und der Aktionspotentialfrequenz im Sinusknoten erklärt den negativ chronotropen Effekt der Substanz (Zeller, 1995). Bei Herzmuskelzellen bewirkt die Substanz durch die Calciumkanalblockade zudem eine Verminderung der Herzmuskelkontraktionskraft (negativ inotroper Effekt), da Calcium für die Aktin-Myosin-Interaktion fehlt. Mit steigender Konzentration gewinnt der Membraneinlageungseffekt der Substanz an Bedeutung, der die unspezifische Inhibition verschiedener Membran Transportsysteme, also eine allgemeine Störung der Membranstruktur zur Folge hat (Fairhurst et al., 1980 zitiert nach Zeller, 1995).

3.1.8 Lipid-Senker

3.1.8.1 Bezafibrat

Aufgrund des $\log K_{ow}$ der Substanz von 4,2, konnte eine Absorption der Substanz an die Wandung der Wellplatten nicht ausgeschlossen werden. Es wurden daher parallel zwei Versuche im gleichen Konzentrationsbereich einmal in der Wellplatte, einmal in Glas durchgeführt. Bezafibrat wurde dabei bis zur Löslichkeitsgrenze in den Konzentrationen 17,3 $\mu\text{mol/L}$, 34,6 $\mu\text{mol/L}$, 69,1 $\mu\text{mol/L}$, 138,2 $\mu\text{mol/L}$ sowie 276,4 $\mu\text{mol/L}$ untersucht.

3.1.8.1.1 Untersuchung in der Wellplatte

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 5 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und nur bei maximal 10% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-100 zusammengefasst. Im untersuchten Konzentrationsbereich zeigten sich nur bei einem Embryo in der niedrigsten untersuchten Konzentration letale Effekte. Dieser war nach 24 Stunden koaguliert.

Tabelle 3-100: Zusammenstellung der letalen Effekte von Bezafibrat während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	17,3	34,6	69,1	138,2	276,4
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	-	1/20	-	-	-	-
	36	-	1/20	-	-	-	-
	48	-	1/20	-	-	-	-
gesamt [%]	48	-	5	-	-	-	-

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-101 zusammenfassend dargestellt. Auch hier zeigten sich nur wenige Effekte an den untersuchten Embryonen (maximal 20%). Aufgrund der fehlenden Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Effekte ist eine Berechnung von EC_x -Konzentrationen nicht möglich.

Tabelle 3-101: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Bezafibrat während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	17,3	34,6	69,1	138,2	276,4
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	-
	48	1/18	-	-	-	1/20	1/20
keine Pigmentierung	48	2/18	2/19	1/20	2/20	4/20	3/20
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	2/20	2/20
Dotterödem	48	-	-	-	-	1/20	1/20
Perikardödem	48	-	-	-	-	1/20	1/20
gesamt	48	-	-	-	-	1/20	1/20
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	-	-	1/20

Bei der Untersuchung der Herzschlagfrequenz zeigte sich in den Konzentrationen 17,3 $\mu\text{mol/L}$ bis 138,2 $\mu\text{mol/L}$ ein leichter, nicht signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. In der höchsten untersuchten Konzentration war die Herzschlagfrequenz im Vergleich zu der Kontrollgruppe leicht, jedoch nicht signifikant reduziert (Abbildung 3-45). Die NOEC entspricht damit der höchsten untersuchten Konzentration von 276,4 $\mu\text{mol/L}$.

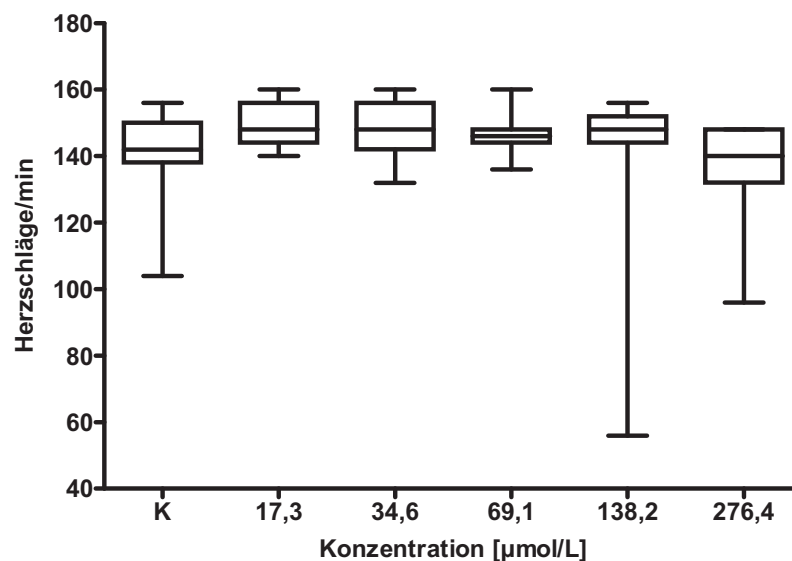


Abbildung 3-45: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Bezafibrat- Konzentration für den Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.

3.1.8.1.2 Untersuchung im Rollrandglas

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 6 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und bei maximal 10% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-102 zusammengefasst. Es zeigten sich nur vereinzelt letale Effekte. In den Konzentrationen 34,6 µmol/L und 138,2 µmol/L war nach 48 Stunden jeweils ein Embryo koaguliert. Eine Berechnung von LC_x-Konzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-102: Zusammenstellung der letalen Effekte von Bezafibrat während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	17,3	34,6	69,1	138,2	276,4
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	1/9	-	1/9	-
gesamt [%]	48	-	-	11	0	11	0

Subletale Effekte waren an den exponierten Embryonen nicht zu beobachten. Ein Kontrollembryo zeigte nach 48 Stunden keine Pigmentierung (Tabelle 3-103). Auffällig war der verfrühte Schlupf nach 48 Stunden in allen Konzentrationen dessen Ursache unklar ist. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der geschlüpften Embryonen.

Tabelle 3-103: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Bezafibrat während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	17,3	34,6	69,1	138,2	276,4
keine Pigmentierung	48	1/10	-	-	-	-	-
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	-
Schlupf	48	8/10	9/10	7/9	7/9	6/9	1/10

In den Konzentrationen 17,3 µmol/l, 69,1 µmol/L sowie 276,4 µmol/L war die Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht (Abbildung 3-46). In den übrigen beiden Konzentrationen, 34,6 µmol/l und 138,2 µmol/L, war sie dagegen leicht erniedrigt. Diese Effekte waren jedoch nicht signifikant. Es wurde mittels Dunetts-Test eine NOEC von 276,4 µmol/L ermittelt, die der höchsten untersuchten Konzentration entspricht.

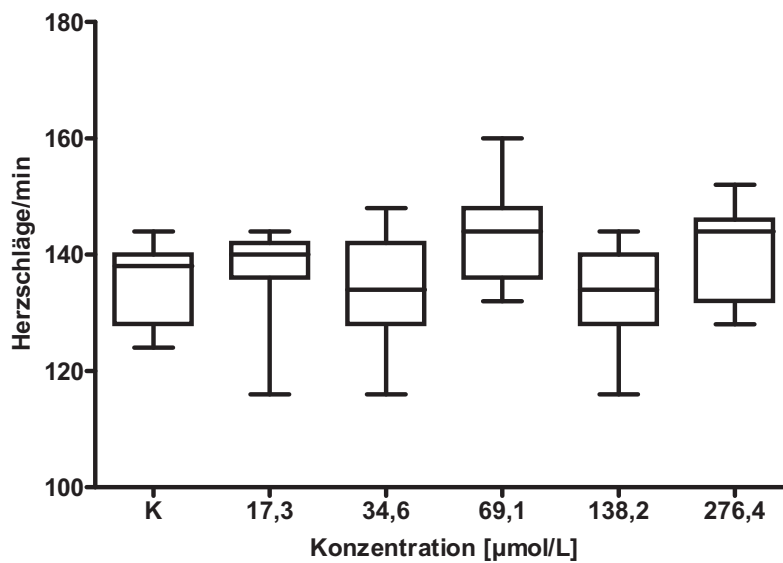


Abbildung 3-46: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Bezafibrat-Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.

In den beiden, mit Bezafibrat durchgeführten Versuchen haben sich ähnliche Effekte an den exponierten Embryonen gezeigt. Es waren in beiden Versuchen nur wenige letale und subletale Effekte zu beobachten. Zudem zeigten sich in beiden Versuchen sowohl ein leichter, nicht-signifikanter Anstieg als auch ein leichter, nicht-signifikanter Abfall der Herzschlagfrequenz der exponierten Embryonen. Der einzige Unterschied war der verfrühte Schlupf von Embryonen nach 48 Stunden während der Exposition im Rollrandglas. Eine Beeinflussung des Testergebnisses durch die Wahl des Materials der Testgefäße kann damit ausgeschlossen werden.

Als Nebenwirkungen bei der Anwendung von Bezafibrat werden eine Reihe von Effekten beschrieben (Roche, 2003). Aufgrund der wenigen beobachteten letalen und subletalen Effekte ist ein Vergleich mit Literaturdaten und damit ein Rückschluss auf eine Ähnlichkeit der Wirkmechanismen im Embryo und Säuger nicht möglich.

3.1.8.2 Clofibrinsäure

Aufgrund der niedrigen pH-Werte (<4) der einzelnen Verdünnungsstufen, die im Vorversuch festgestellt wurden, wurden zwei verschiedene Ansätze der Substanz untersucht. In einem Versuch wurde der pH-Wert der Stammlösung nicht eingestellt. In einem zweiten Versuch wurde der pH der Stammlösung mit 0,1N NaCl-Lösung und 0,1N HCl auf 7,5 eingestellt.

3.1.8.2.1 ohne Einstellung des pH-Wertes

Die Substanz wurde in diesem Versuch in den Konzentrationen 131,1 µmol/l, 262,1 µmol/L, 524,2 µmol/L, 1048,5 µmol/L sowie 2096,9 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Aufgrund des geringen pH-Wertes der Stammlösung und damit der einzelnen Verdünnungen kann eine Beeinträchtigung der Embryonen durch den niedrigen pH-Wert nicht ausgeschlossen werden. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 13 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 10,5% subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-104 zusammengefasst. Ab 262,1 µmol/L zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte, wobei ab dieser Konzentration alle eingesetzten Embryonen innerhalb von 36 Stunden koaguliert waren. Lediglich die Embryonen in der niedrigsten Konzentration entwickelten sich normal. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 185,4 µmol/L (r^2 : 1,000; b: 20,536; LC10: 160,6 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-104: Zusammenstellung der letalen Effekte von Clofibrinsäure im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	131,1	262,1	524,2	1048,5	2096,9
Koagulation	4	-	-	-	7/19	10/20	20/20
	8	-	-	-	19/19	20/20	20/20
	12	-	-	-	19/19	20/20	20/20
	24	1/20	-	19/20	19/19	20/20	20/20
	36	1/20	-	20/20	19/19	20/20	20/20
	48	1/20	-	20/20	19/19	20/20	20/20
gesamt [%]	48	5	-	100	100	100	100

Aufgrund der steilen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Substanz konnten nur vereinzelt subletale Effekte an den exponierten Embryonen beobachtet werden (Tabelle 3-105). Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-105: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Clofibrinsäure im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	131,1	262,1	524,2	1048,5	2096,9
keine hohe Blastula	4	-	-	-	3/12	1/10	koa
keine Schwanzablösung	24	-	-	1/1	koa	koa	koa
	36	-	-	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	koa	koa	koa	koa
deformierte® Augen/ Kopf	24	-	-	1/1	koa	koa	koa
	36	-	-	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	koa	koa	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	1/1	koa	koa	koa
	36	-	-	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	koa	koa	koa	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	1/1	koa	koa	koa
	36	-	-	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	koa	koa	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	8/19	6/20	koa	koa	koa	koa
	48	2/19	-	koa	koa	koa	koa
keine Pigmentierung	48	1/19	-	koa	koa	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	1/19	1/20	koa	koa	koa	koa
Dotterödem	48	2/19	-	koa	koa	koa	koa
Perikardödem	48	2/19	-	koa	koa	koa	koa
gesamt	48	2/19	-	koa	koa	koa	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	1/19	-	koa	koa	koa	koa

Aufgrund der pH-abhängigen Koagulation der Embryonen konnte nur die Herzschlagfrequenz für die Embryonen in der niedrigsten untersuchten Konzentration bestimmt werden. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede zu den Embryonen der Kontrollgruppe (Abbildung 3-47). Es wurde mittels Dunetts-Test eine NOEC von 131,1 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

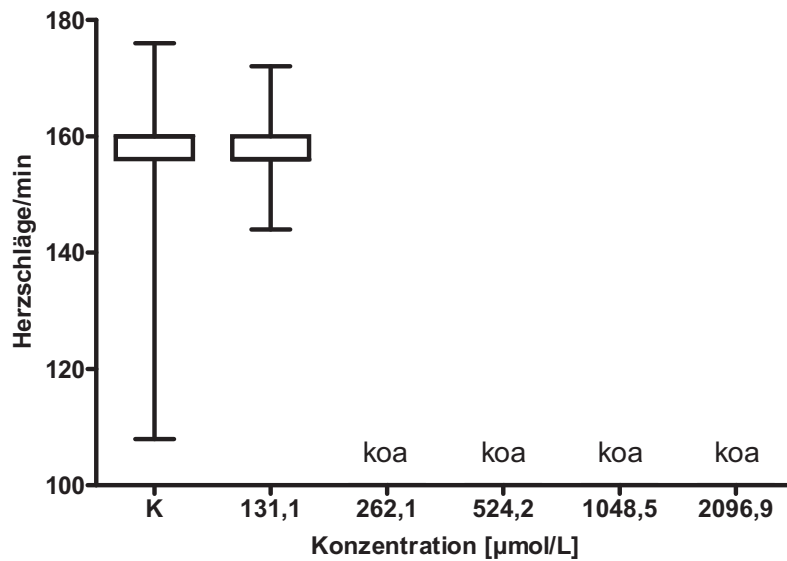


Abbildung 3-47: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clofibrinsäure-Konzentration im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

3.1.8.2.2 mit Einstellung des pH-Wertes

Clofibrinsäure wurde in diesem Versuch in den Konzentrationen 174,7 µmol/L, 349,5 µmol/L, 699 µmol/L, 1398 µmol/l sowie 2796 µmol/L untersucht, wobei die höchste Konzentration nahe der Löslichkeitsgrenze der Substanz lag.

Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Der pH-Wert der Stammlösung wurde vor Versuchsbeginn mit 0,1N NaOH- und 0,1N HCl-Lösung auf 7,5 eingestellt. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 14 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine letalen nur bei maximal 5,3% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Im untersuchten Konzentrationsbereich traten an den exponierten Embryonen keine letalen Effekte auf.

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-106 dargestellt. Lediglich in der höchsten untersuchten Konzentration zeigten sich deutliche subletale Effekte (>10%). In dieser Konzentration zeigten nach 48 Stunden sechs Embryonen (30%) keinen Blutkreislauf und hatten Ödeme ausgebildet. Bei fünf dieser Embryonen (25%) war zudem die Pigmentierung reduziert. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-106: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Clofibrinsäure im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	174,7	349,5	699,0	1398,0	2796,0
kein Blutkreislauf	48	1/19	-	-	-	1/20	6/20
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	-
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	1/20	-	-	5/20
Dotterödem	48	1/19	-	-	-	1/20	6/20
Perikardödem	48	1/19	-	-	-	1/20	6/20
gesamt	48	1/19	-	-	-	1/20	6/20

Wie Abbildung 3-48 zu entnehmen ist, zeigte sich innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs keine Beeinflussung der Herzschlagfrequenz durch Clofibrinsäure. Anhand der beobachteten Herzschlagfrequenzen konnte mittels Dunetts Test eine NOEC von 2796 $\mu\text{mol/L}$ bestimmt werden, die der höchsten untersuchten Konzentration entspricht.

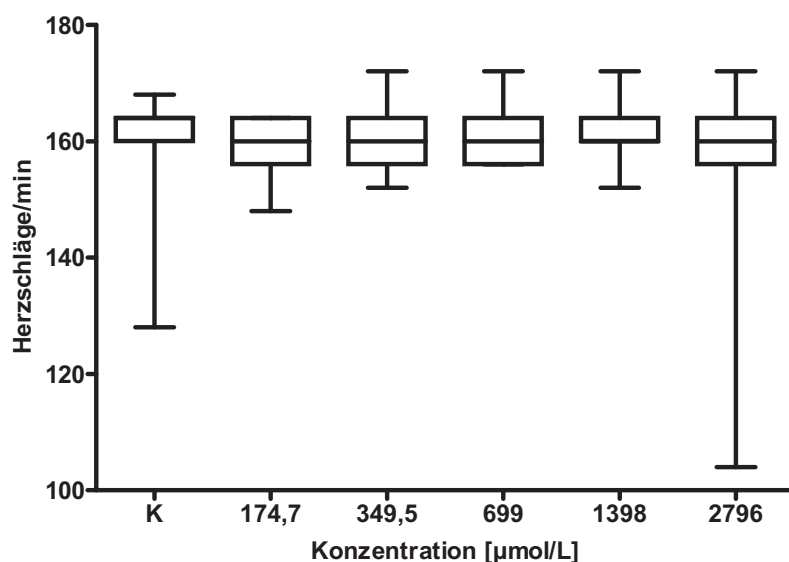


Abbildung 3-48: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clofibrinsäure- Konzentration im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.

In den beiden durchgeführten Versuchen haben sich pH-bedingt deutliche Toxizitätsunterschiede ergeben. Im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes konnte ein $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 185,4 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt werden, während im Versuch mit pH-Einstellung keinerlei letale Effekte zu beobachten waren. Jedoch zeigten sich in beiden Versuchen nur wenige subletale Effekte.

Emblidge und DeLorenzo (2006) haben Clofibrinsäure in umweltrelevanten Konzentrationen (0,0005-4,7 µmol/L) untersucht. In ihren Tests an *Fundulus heteroclitus* zeigten sich weder letale noch subletale Effekte.

Ferrari et al. (2003) untersuchten Embryonen des Zebraäbrblings in einem 10-Tage early-life-stage Test und geben eine NOEC(10d) von 3,3 µmol/L sowie eine LOEC(10d) von 6,5 µmol/L basierend auf dem Schlupferfolg an. Henschel et al. (1997) geben eine LC₅₀(48h) von 400,7 µmol/L für Embryonen des Zebraäbrblings an, die recht gut mit der LC₅₀ aus der vorgestellten Untersuchung ohne pH-Wert-Einstellung von 185,4 µmol/L übereinstimmt. Neben der Koagulation der Embryonen wurden auch das Auftreten von Ödemen, fehlender Herzschlag und Blutkreislauf, sowie die Reduktion der Herzschlagfrequenz auf unter 40% der der Kontrollen als letale Effekte gewertet. Auch sie berichten von pH-Werten von unter 4,7 bei Konzentrationen über 1165 µmol/L. Die Autoren gehen auch davon aus, dass in dieser und den Konzentrationen darüber keine Unterscheidung von pH-bedingten und substanzspezifischen Effekten möglich ist.

Nunes et al. (2005) untersuchten die Toxizität von Clofibrinsäure an Organismen mit verschiedenen Salzpräferenzen. In einem Test nach OECD 203 ermittelten sie für den euryhalinen Moskitofisch, *Gambusia holbrooki*, eine LC₅₀(96h) von 2453,4 µmol/L, die deutlich über der in den vorgestellten Untersuchungen ermittelten LC₅₀(48h) liegt.

3.1.8.3 Fenofibrat

Aufgrund des logK_{ow} der Substanz von 4,3^{FS} wurden zwei Versuche im gleichen Konzentrationsbereich einmal in der Wellplatte, einmal in Glas durchgeführt. Fenofibrat wurde dabei bis zur Löslichkeitsgrenze in den Konzentrationen 41,0 µmol/L, 61,6 µmol/L, 92,4 µmol/L, 138,6 µmol/L sowie 207,9 µmol/L untersucht.

3.1.8.3.1 Untersuchung in der Wellplatte

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 22 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 10% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 5,6 % subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-107 zusammengefasst. Es zeigten sich im untersuchten Konzentrationsbereich nur vereinzelt letale Effekte. Eine Berechnung von LC_x-Konzentrationen war daher nicht sinnvoll.

^{FS} : logK_{ow} von Fenofibrinsäure

Tabelle 3-107: Zusammenstellung der letalen Effekte von Fenofibrat während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	41,0	61,6	92,4	138,6	207,9
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	1/20	-	1/20	-	-
	12	-	1/20	-	1/20	-	-
	24	1/20	3/20	-	3/20	1/20	-
	36	2/20	3/20	-	3/20	1/20	-
	48	2/20	3/20	1/20	3/20	1/20	-
gesamt [%]	48	10	15	5	15	5	-

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-108 zusammengefasst. Innerhalb der 48-stündigen Exposition der Embryonen gegenüber Fenofibrat zeigten sich nur wenige subletale Effekte bei maximal 35% der eingesetzten Embryonen einer Konzentration. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-108: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Fenofibrat während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle, -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	41,0	61,6	92,4	138,6	207,9
keine Gastrulation	8	-	-	-	5/19	2/20	-
	12	-	-	-	1/19	1/20	-
keine Schwanzablösung/ Somiten	24	-	-	1/20	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
deformierte Augenanlage	24	-	-	1/20	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Kopf	24	-	-	1/20	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Schwanz	24	-	1/17	1/20	-	-	-
	36	-	1/17	-	-	-	-
	48	-	1/17	-	-	-	-
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	1/20	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	1/17	-	-	-	-
kein Blutkreislauf	36	1/18	1/17	1/20	1/17	-	-
	48	-	1/17	-	3/17	1/19	1/20
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	1/20
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	4/17	4/19	5/20
Dotterödem	48	1/18	1/17	-	5/17	2/19	3/20
Perikardödem	48	-	1/17	-	6/17	2/19	2/20
gesamt	48	1/18	1/17	-	6/17	2/19	3/20
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	1/17	-	-

Wie Abbildung 3-49 zu entnehmen ist, zeigte sich im untersuchten Konzentrationsbereich keine signifikante Beeinflussung der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurde eine NOEC von 207,9 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt, die der höchsten getesteten Konzentration entspricht.

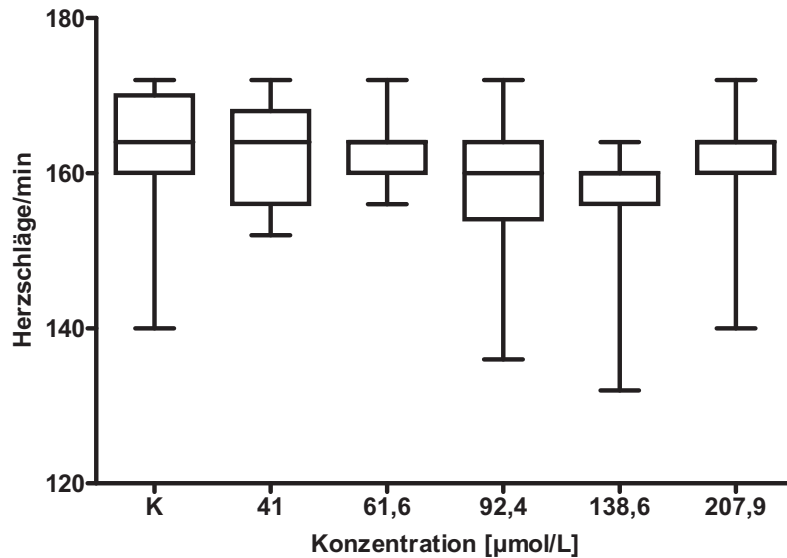


Abbildung 3-49: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Fenofibrat-Konzentration beim Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.

3.1.8.3.2 Untersuchung im Rollrandglas

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen vor Testbeginn in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 23 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen weder letale noch subletale Effekte zu beobachten waren.

Die beobachteten letalen Effekte sind in Tabelle 3-109 zusammengefasst. Es koagulierte nur ein Embryo in 92,4 $\mu\text{mol/L}$. Eine Berechnung von LC_x -Konzentrationen war daher nicht sinnvoll.

Tabelle 3-109: Zusammenstellung der letalen Effekte von Fenofibrat während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	41,0	61,6	92,4	138,6	207,9
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	1/10	-	-
gesamt [%]	48	-	-	-	10	-	-

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-110 zusammengefasst. Innerhalb der 48-stündigen Exposition der Embryonen gegenüber Fenofibrat in den Rollrandgläsern zeigten sich nur wenige subletale Effekte. In den Konzentrationen 41,0 $\mu\text{mol/L}$, 61,6 $\mu\text{mol/L}$ und 138,6 $\mu\text{mol/L}$ hatte jeweils ein Embryo Ödeme an Dotter und Perikard ausgebildet. Der Blutkreislauf war bei allen drei Keimen schwächer ausgebildet als bei den Kontrollembryonen. In der höchsten untersuchten Konzentration zeigte nach 24 Stunden ein Embryo eine verzögerte Entwicklung. Seine Augenanlage war nur unvollständig ausgebildet und sein Schwanz verkürzt. Nach 48 Stunden fehlte ihm der Blutkreislauf, die Pigmentierung war reduziert und er hatte Ödeme ausgebildet. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war aufgrund der wenigen beobachteten Effekte nicht sinnvoll.

Tabelle 3-110: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Fenofibrat während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet)

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	41,0	61,6	92,4	138,6	207,9
deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	-	1/10
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	1/10
	48	-	-	-	-	-	-
kein Blutkreislauf	48	-	-	-	-	-	1/10
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	-
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	1/10
Dotterödem	48	-	1/10	1/10	-	1/10	1/10
Perikardödem	48	-	1/10	1/10	-	1/10	1/10
gesamt	48	-	1/10	1/10	-	1/10	1/10

Anhand der ermittelten Herzschlagfrequenzen konnte keine NOEC berechnet werden, da bereits ab der niedrigsten untersuchten Konzentration die Herzschlagfrequenz der exponierten Embryonen signifikant reduziert war (Abbildung 3-50). Es wurde eine LOEC von 41,0 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

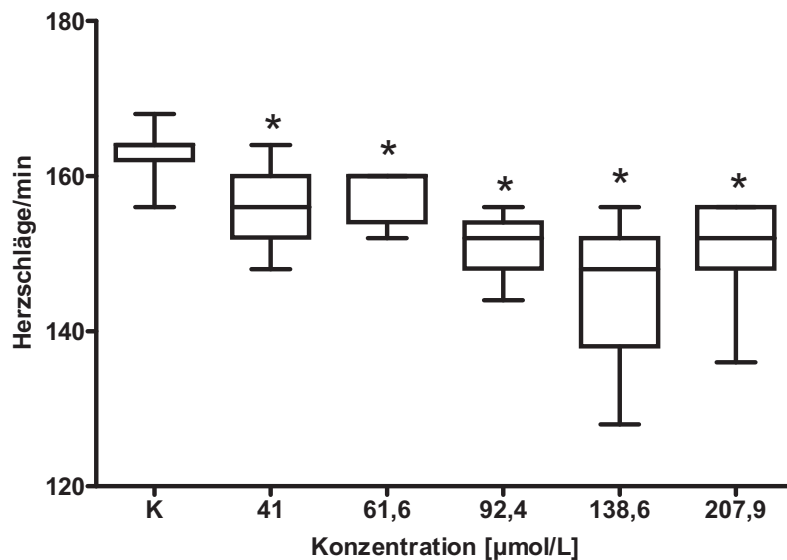


Abbildung 3-50: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Fenofibrat-Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$).

In den beiden durchgeführten Versuchen mit Fenofibrat zeigten sich lediglich Unterschiede in der Herzschlagfrequenz der exponierten Embryonen. Während sich bei den Embryonen in der Wellplatte keine signifikante Beeinflussung der Herzschlagfrequenz zeigte, war bei den Embryonen im Rollrandglas die Herzschlagfrequenz bis in die niedrigste untersuchte Konzentration signifikant reduziert. Es ist unklar, ob die Wahl des Materials der Testgefäße die Ursache für diese Beobachtung ist.

Aufgrund der wenigen beobachteten Effekte ist ein Vergleich mit Literaturdaten nicht möglich.

3.1.8.4 Lipid- Senker- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden die drei Substanzen Bezafibrat, Clofibrinsäure und Fenofibrat als Einzelstoffe untersucht. Es zeigten sich bei allen drei untersuchten Substanzen bis zur Löslichkeitsgrenze nur vereinzelt letale Effekte. Die Ausnahme ist hier der Versuch mit Clofibrinsäure ohne pH- Wert-Einstellung. Hier zeigte sich pH-bedingt die Koagulation der Embryonen ab einer Konzentration von 262,1 µmol/L.

Auch subletale Effekte zeigten sich bei allen drei Stoffen nur vereinzelt, wobei ähnliche Effekte, d.h. eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufs und der Pigmentierung sowie Ödeme zu beobachten waren (Abbildung 3-51).

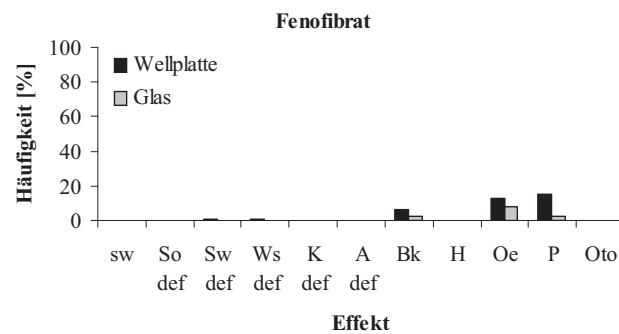
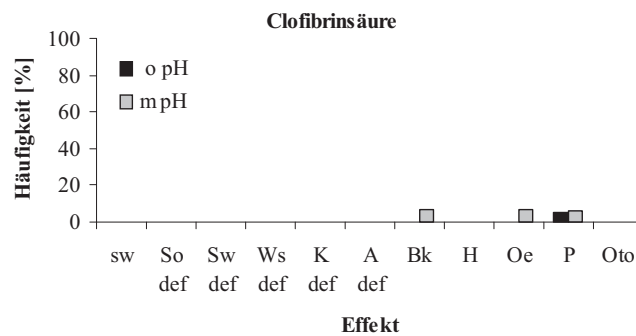
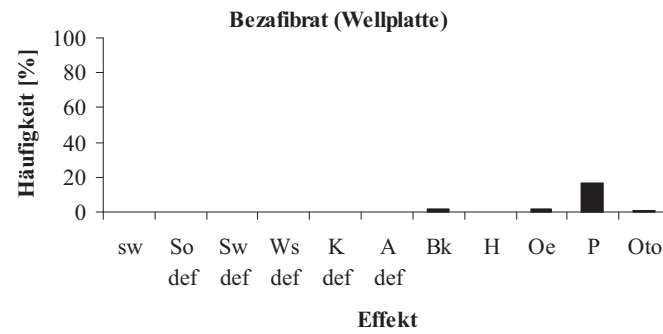


Abbildung 3-51: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den beiden Lipid-Senkern Bezafibrat und Fenofibrat sowie des Lipid-Senker-Metaboliten Clofibrinsäure (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somi-tendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

In der Humanmedizin werden die beiden Fibrate Bezafibrat und Fenofibrat als Lipid-Senker eingesetzt. Diese Substanzen führen zu einer Senkung der Cholesterin- und Triglyce-ridkonzentration im Blutplasma. Dies geschieht indem über eine Klasse nukleärer Transkriptionsfaktoren, die Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR- α), meh-rere Stoffwechselwege der Lipoproteine in der Leberzelle beeinflusst werden. Die Fibrate binden an die PPAR- α und aktivieren die Transkription mehrerer Gene, die den Lipoprotein-

Metabolismus kontrollieren (Forth et al., 2001). Sie aktivieren überdies wahrscheinlich die Lipoprotein-Lipase, welche LDL (low density lipoproteins) in HDL (high density lipoproteins) umwandelt und damit die Plasma-Triglycerid-Konzentration herabsetzt. PPARs wurden in Fischen nachgewiesen (Ibabe et al., 2002). Ibabe et al. (2005a) konnten zeigen, dass die PPAR-Rezeptoren bereits in sieben Tage alten Larven von *Danio rerio* expremiert werden und ihre Gewebsverteilung ähnlich der in adulten Zebrabärblingen ist. Sie spielen zudem eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung und Differenzierung verschiedener Gewebe in Säugern. Fibrate sind Aktivatoren der PPARs, wie Ibabe et al. (2005b) für Clofibrinsäure in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 2 mM zeigen konnten.

3.1.9 Pflanzenschutzmittel (PSM)

3.1.9.1 Carbaryl

In Anlehnung an Schulte (1997) wurde Carbaryl in den Konzentrationen 10,9 µmol/L, 16,3 µmol/L, 24,4 µmol/L, 36,3 µmol/L sowie 54,2 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 9 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen keine letalen und nur bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-111 zusammengefasst. Ab 24,4 µmol/L zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. In den Konzentrationen 36,3 und 54,2 µmol/L waren nach 12 Stunden bereits acht bzw. 16 Embryonen koaguliert. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 39,4 µmol/L (r^2 : 0,975, b: 7,581, LC₁₀: 26,7 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-111: Zusammenstellung der letalen Effekte von Carbaryl (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	10,9	16,3	24,4	36,3	54,2
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
-	8	-	1/20	-	-	6/20	16/20
	12	-	1/20	-	-	8/20	16/20
	24	-	1/20	-	1/20	8/20	16/20
	36	-	1/20	-	1/20	8/20	17/20
	48	-	1/20	-	1/20	8/20	17/20
gesamt [%]	48	-	5	-	5	40	85

Die beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-112 zusammenfassend dargestellt. In den Konzentrationen 24,4 und 36,3 µmol/L zeigten nach 8 Stunden 15% bzw. 14,3% der Embryonen keine Gastrulation. Vereinzelt zeigten sich nach 24 Stunden eine verzögerte Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule. Auch konnten eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme beobachtet werden. Effekte auf die Pigmentierung traten bis in die niedrigste untersuchte Konzentration auf.

Tabelle 3-112: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Carbaryl (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	10,9	16,3	24,4	36,3	54,2
keine Gastrulation	8	-	-	-	3/20	2/14	-
	12	-	-	-	-	-	-
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	1/19	-	2/4
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
keine oder deformierte Somitenanlage	24	-	-	-	1/19	-	1/4
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
deformierter Augen	24	-	-	-	2/19	-	2/4
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
Schwanzdeformation	24	-	-	-	1/19	-	1/4
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
Wirbelsäulendeformation	24	-	-	-	1/19	-	1/4
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	1/3
	48	-	-	-	1/19	-	-
kein Blutkreislauf	36	6/20	2/19	7/20	10/19	6/12	3/3
	48	-	-	-	2/19	7/12	3/3
keine Pigmentierung	48	-	1/19	-	-	2/12	1/3
reduzierte Pigmentierung	48	1/20	2/19	1/20	4/19	4/12	2/3
Dotterödem	48	-	-	1/20	3/19	7/12	2/3
Perikardödem	48	1/20	-	1/20	1/19	-	2/3
gesamt	48	1/20	-	2/20	4/19	7/12	3/3

Wie Abbildung 3-51 zu entnehmen ist, zeigte sich ab der Konzentration 24,4 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Es wurden mittels Dunetts-Test eine NOEC von 16,3 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 24,4 $\mu\text{mol/L}$ berechnet.

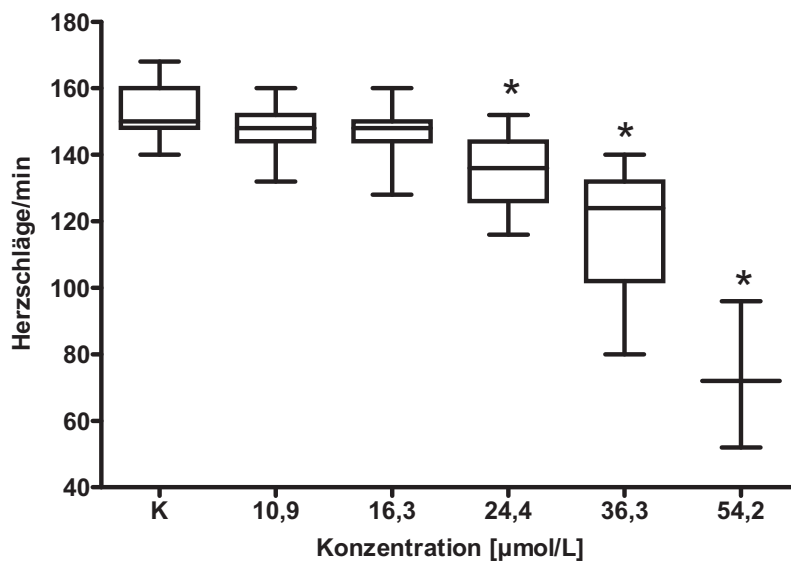


Abbildung 3-52: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Carbaryl-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-113 zusammengestellt.

Tabelle 3-113: Zusammenfassung der berechneten Werte für Carbaryl.

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	39,4
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	34,2
EC_{50} Ödeme	48	33,7
EC_{50} Pigmentierung	48	25,5
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	16,3
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	24,4

In Untersuchungen von Schulte (1997) mit Carbaryl zeigten sich ähnliche Effekte. Auch er konnte zeigen, dass die letale Wirkung von Carbaryl auf frühe Einflüsse zurückzuführen ist. Sowohl in seiner als auch in der vorgestellten Untersuchung koagulierten die meisten Embryonen innerhalb von 8 Stunden. Er ermittelte eine $LC_{50}(48h)$ von 23,4 µmol/L basierend auf allen vier letalen Endpunkten. Diese stimmt recht gut mit der ermittelten $LC_{50}(48h)$ von 39,4 µmol/L, basierend auf den koagulierten Embryonen überein. Er beschreibt zudem Deformationen der hohen Blastula und der Gastrulationsstadien sowie eine verzögerte Gastrulation und Somitenbildung, Effekte die in der vorgestellten Untersuchung nur vereinzelt beobachtet werden konnten. Übereinstimmend zeigten sich eine reduzierte Herzschlagfrequenz, fehlender Blutkreislauf sowie Ödeme und Deformationen.

Weis und Weis (1974) konnten sowohl einen Entwicklungsarrest als auch eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems in Embryonen von *Fundulus heteroclitus* zeigen. Solomon und Weis (1979) beobachteten Kreislaufanomalien während der Entwicklung des Medakas (*Oryzias latipes*) in Form von Defekten in der Herzmorphologie, Perikardödemen, unregelmäßigem Herzschlag sowie Verklumpung der Blutkörperchen. Todd & van Leeuwen (2002) berichten von einer Verzögerung der Entwicklung und des Schlupfes von Embryonen des Zebrafisches bei der Exposition gegenüber Verdünnungen des Carbaryl-Insektizids Sevin.

3.1.9.2 Malathion

Malathion wurde in den Konzentrationen 9,1 µmol/L, 18,2 µmol/L, 36,3 µmol/L, 72,7 µmol/L, 145,3 µmol/L sowie 290,6 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen vor Testbeginn in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 27 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 10% der eingesetzten Embryonen letale bzw. subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-114 zusammengefasst. Es zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte, wobei in den drei höchsten untersuchten Konzentrationen alle eingesetzten Embryonen innerhalb der 48-stündigen Expositionsdauer koagulierten. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 25,5 µmol/L (r^2 : 1,0, b: 10,341, LC_{10} : 19,1 µmol/L) berechnet.

Tabelle 3-114: Zusammenstellung der letalen Effekte von Malathion (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]						
		K	9,1	18,2	36,3	72,7	145,3	290,6
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-	1/20
	8	-	-	-	-	8/20	19/20	20/20
	12	-	-	-	2/20	16/20	20/20	20/20
	24	-	-	-	2/20	19/20	20/20	20/20
	36	-	-	1/20	2/20	19/20	20/20	20/20
	48	2/22	1/19	3/20	19/20	20/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	9	5	15	95	100	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-115 zusammenfassend dargestellt. Nach 8 Stunden zeigten ab 18,2 µmol/L konzentrationsabhängig Embryonen keine Gastrulation. Auch konnten Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Augen, Kopf und Schwanz beobachtet werden. Eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme traten bis in die nied-

rigste untersuchte Konzentration auf. Auch zeigte sich bis in die niedrigste Konzentration eine Beeinflussung der Pigmentierung. Die Otolithen fehlten bei dem einzigen nicht-koagulierten Embryo in 36,3 µmol/L

Tabelle 3-115: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Malathion (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]						
		K	9,1	18,2	36,3	72,7	145,3	290,6
keine Gastrulation	8	-	-	3/20	15/20	10/12	1/1	koa
	12	-	-	-	-	-	koa	koa
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	1/18	1/1	koa	koa
	36	-	-	-	-	1/1	koa	koa
	48	-	-	-	1/1	koa	koa	koa
keine oder deformierte Somiten	24	-	1/19	9/20	18/18	-	koa	koa
	36	-	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	koa	koa	koa
keine / deformierte Augenanlage	24	-	1/19	9/20	18/18	1/1	koa	koa
	36	-	-	-	-	1/1	koa	koa
	48	-	-	-	1/1	koa	koa	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	2/18	1/1	koa	koa
	36	-	-	-	-	1/1	koa	koa
	48	-	-	-	1/1	koa	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	1/19	10/20	18/18	1/1	koa	koa
	36	-	-	-	18/18	1/1	koa	koa
	48	-	3/19	13/17	1/1	koa	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	-	11/19	18/18	1/1	koa	koa
	48	-	1/19	5/17	1/1	koa	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	14/22	19/19	19/19	18/18	1/1	koa	koa
	48	1/20	18/18	17/17	1/1	koa	koa	koa
keine Pigmentierung	48	-	1/18	5/17	1/1	koa	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	13/18	12/17	-	koa	koa	koa
Dotterödem	48	-	18/18	17/17	1/1	koa	koa	koa
Perikardödem	48	-	17/18	17/17	1/1	koa	koa	koa
gesamt	48	-	18/18	17/17	1/1	koa	koa	koa
keine Otolithen	48	-	-	-	1/1	koa	koa	koa

Wie Abbildung 3-53 zu entnehmen ist, zeigte sich bereits ab der niedrigsten untersuchten Konzentration eine signifikante Verringerung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Eine Berechnung einer NOEC war daher nicht möglich. Mittels Dunetts-Test wurde eine LOEC von 9,1 µmol/L ermittelt.

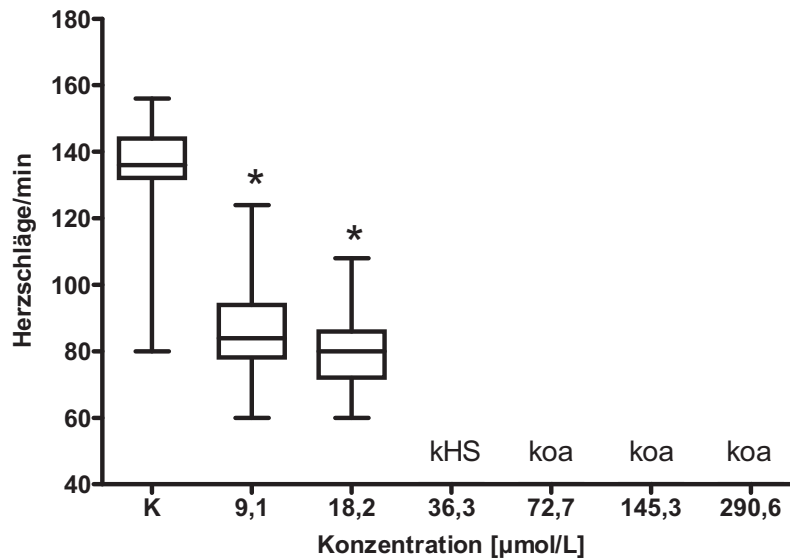


Abbildung 3-53: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Malathion-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-116 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-116: Zusammenfassung der berechneten Werte für Malathion (aE: bis in die niedrigste untersuchte Konzentration zeigen alle Embryonen diesen Effekt; -: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[mmol/L]
LC_{50}	48	25,5
EC_{50} kein Herzschlag	48	20,3
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	aE
EC_{50} Ödeme	48	aE
EC_{50} Pigmentierung	48	7,2
EC_{50} Schwanzdeformation	48	13,5
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	9,1

Schulte (1997) gibt für Malathion, basierend auf allen vier letalen Endpunkten eine $LC_{50}(48h)$ von $18,8 \mu\text{mol/L}$ an, die recht gut mit der in den vorliegenden Untersuchungen, basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen ermittelten LC_{50} von $25,5 \mu\text{mol/L}$ übereinstimmt. Er berichtet zudem von Entwicklungsstörungen während der Gastrulation und der Anlage der ersten Somiten sowie fehlendem Blutkreislauf. Auch konnten Ödeme, Deformationen und eine reduzierte Herzschlagfrequenz beobachtet werden. Ähnliche Effekte wurden auch im vorgestellten Experiment beobachtet.

Cook et al. (2005) exponierten Embryonen des Zebrafisches gegenüber Malathion in Konzentrationen von 1,5 bis 9,1 µmol/L. In den Konzentrationen 1,5 bis 4,5 µmol/L schlüpfen die Embryonen eher aus dem Chorion als in den Konzentrationen 6,1 bis 9,1 µmol/L. Die Embryonen dieser Konzentrationen zeigten zudem eine signifikant reduzierte Körperlänge und auch einen kleineren Augendurchmesser. Die Autoren sehen darin Indikatoren für teratogene Effekte der Substanz.

Ansari und Kumar (1986) berichten von Skelettmissbildungen in sich entwickelnden Zebrafischen während der Exposition gegenüber Malathion. Entsprechende Effekte wurden auch in adulten Tieren beobachtet (Kumar und Ansari, 1984). Ähnliche Effekte konnten auch für andere Fischarten gezeigt werden (Cook et al., 2005). Solomon und Weis (1979) konnten Kreislaufanomalien in Form von Defekten in der Herzmorphologie, Perikardödemen, unregelmäßigem Herzschlag sowie Verklumpung der Blutkörperchen während der Entwicklung des Medakas (*Oryzias latipes*) beobachten.

Frayse et al. (2006) berichten von Perikard- und Dotterödemen sowie von Schwanzdeformationen bei der Exposition von Embryonen des Zebrafisches gegenüber Malathion.

3.1.9.3 Parathion

Nach einem Vorversuch wurde Parathion in den Konzentrationen 19 µmol/L, 28,5 µmol/L, 42,7 µmol/L, 64,1 µmol/L sowie 96,2 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 35 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 6,3% der eingesetzten Embryonen letale bzw. subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-117 zusammengefasst. Ab der Konzentration 28,5 µmol/L zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es konnte eine LC₅₀(48h) von 32,5 µmol/L (r^2 : 1,000, b: 10,537, LC₁₀: 24,6 µmol/L) ermittelt werden.

Tabelle 3-117: Zusammenstellung der letalen Effekte von Parathion-methyl (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	19,0	28,5	42,7	64,1	96,2
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	1/19	13/20	18/20	18/20
	12	-	-	4/19	16/20	20/20	20/20
	24	1/17	-	4/19	18/20	20/20	20/20
	36	1/17	-	5/19	18/20	20/20	20/20
	48	1/17	-	6/19	18/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	6	-	32	90	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition der Embryonen beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-118 zusammenfassend dargestellt. Nach 8 Stunden zeigten ab 28,5 µmol/L konzentrationsabhängig Embryonen keine Gastrulation. Vereinzelt zeigten sich Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Somiten, Augen und Kopf. Deformationen an Schwanz und Wirbelsäule waren ab der niedrigsten untersuchten Konzentration bzw. ab 28,5 µmol/L konzentrationsabhängig zu beobachten. Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem und Ödeme traten ebenfalls ab der niedrigsten untersuchten Konzentration auf, ebenso eine Beeinträchtigung der Pigmentierung. Die Otolithen fehlten bei einem von zwei nicht-koagulierten Embryonen in 42,7 µmol/L.

Tabelle 3-118: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Parathion-methyl (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	19,0	28,5	42,7	64,1	96,2
keine Gastrulation	8	-	-	2/18	4/7	2/2	2/2
keine Schwanzablösung	24	-	-	1/15	1/2	koa	koa
	36	-	-	-	1/2	koa	koa
	48	-	-	-	1/2	koa	koa
keine oder deformierte Somitenanlage	24	-	-	1/15	1/2	koa	koa
	36	-	-	-	1/2	koa	koa
	48	-	-	-	1/2	koa	koa
keine oder deformierte Augenanlage	24	-	-	1/15	1/2	koa	koa
	36	-	-	-	1/2	koa	koa
	48	-	-	-	1/2	koa	koa
deformierter Kopf	24	-	-	1/15	1/2	koa	koa
	36	-	-	-	1/2	koa	koa
	48	-	-	-	1/2	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	1/15	1/2	koa	koa
	36	-	-	2/14	2/2	koa	koa
	48	-	3/19	5/13	2/2	koa	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	1/15	1/2	koa	koa
	36	-	-	-	1/2	koa	koa
	48	-	-	2/13	1/2	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	-	1/14	1/2	koa	koa
	48	-	-	-	1/2	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	4/16	14/19	13/14	2/2	koa	koa
	48	1/16	3/19	6/13	2/2	koa	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	4/13	1/2	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	4/19	5/13	1/2	koa	koa
Dotterödem	48	-	7/19	9/13	1/2	koa	koa
Perikardödem	48	1/16	2/19	7/13	1/2	koa	koa
gesamt	48	1/16	8/19	10/13	1/2	koa	koa
keine Otolithen	48	-	-	-	1/2	koa	koa

Wie Abbildung 3-54 zu entnehmen ist, zeigte sich bereits ab der niedrigsten untersuchten Konzentration eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Eine Berechnung einer NOEC war daher nicht möglich. Es wurde eine LOEC von 19 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

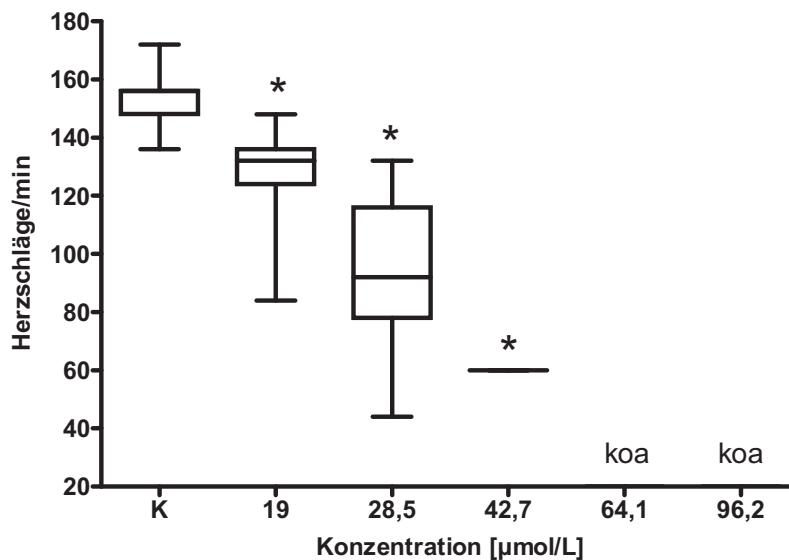


Abbildung 3-54: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Parathion-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunnett-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-119 zusammengestellt.

Tabelle 3-119: Zusammenfassung der berechneten Werte für Parathion (-: keine Angabe möglich).

Effekt	Zeit [h]	[$\mu\text{mol/L}$]
LC_{50}	48	32,5
EC_{50} kein Herzschlag	48	42,7
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	29,3
EC_{50} Ödeme	48	20,6
EC_{50} Pigmentierung	48	24,3
EC_{50} Schwanzdeformation	48	29,7
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	42,2
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	19,0

In der Literatur finden sich $LC_{50}(48\text{h})$ -Werte für adulte Zebraabärblinge von 8,2 bis 21,4 $\mu\text{mol/L}$ (Roex et al., 2002a). Der im Test ermittelte Wert von 32,5 $\mu\text{mol/L}$ liegt etwas

darüber. Subletal zeigten sich v.a. Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem. Weis und Weis (1974) beschreiben eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems in Embryonen von *Fundulus heteroclitus*. Solomon und Weis (1979) berichten ebenfalls von Kreislaufanomalien während der Entwicklung des Medakas (*Oryzias latipes*) in Form von Defekten in der Herzmorphologie, Perikardödemen, unregelmäßigem Herzschlag sowie Verklumpung der Blutkörperchen. Roex et al. (2002b) konnten einen negativen Effekte von Parathion auf das Wachstum der frühen Lebensstadien von *Danio rerio* ab einer Konzentration von 0,08 µmol/L zeigen , wobei das Wachstum über das Feuchtgewicht der Tiere bestimmt worden war.

3.1.9.4 Pflanzenschutzmittel- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden die drei Acetylcholinesterasehemmer Carbaryl, Malathion und Parathion als Einzelstoffe untersucht. Alle drei Substanzen sind in ihrer Toxizität auf die Embryonen des Zebraäbrblings vergleichbar. Wie Tabelle 3-120 zu entnehmen ist, liegen die berechneten LC₅₀-Werte nach 48 Stunden in einem ähnlichen Bereich.

Tabelle 3-120: Darstellung der anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten LC₅₀-Werte nach 48 Stunden für die drei Pflanzenschutzmittel.

	LC ₅₀ (48h), [µmol/L]		
Carbaryl	Malathion	Parathion	
39,4	25,5	32,5	

Wie Abbildung 3-55 zu entnehmen ist, zeigten sich bei allen drei Substanzen Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem und die Pigmentierung, auch wurden bei allen drei Stoffen Ödeme beobachtet. Auffällig ist dabei, dass die geringsten Effekte bei Carbaryl zu beobachten waren. Ebenso zeigten sich im Einzelsubstanzversuch mit Carbaryl keine Deformationen oder Effekte auf die Otolithen, wie sie bei Malathion und Parathion zu beobachten waren. Bei allen drei Stoffen traten jedoch bereits Effekte an den frühen Entwicklungsstadien der Embryonen sowie eine konzentrationsabhängige Reduktion der Herzschlagfrequenz auf.

Für alle drei Substanzen werden zudem auch in der Literatur ähnliche Effekte beschrieben (Solomon und Weis, 1979).

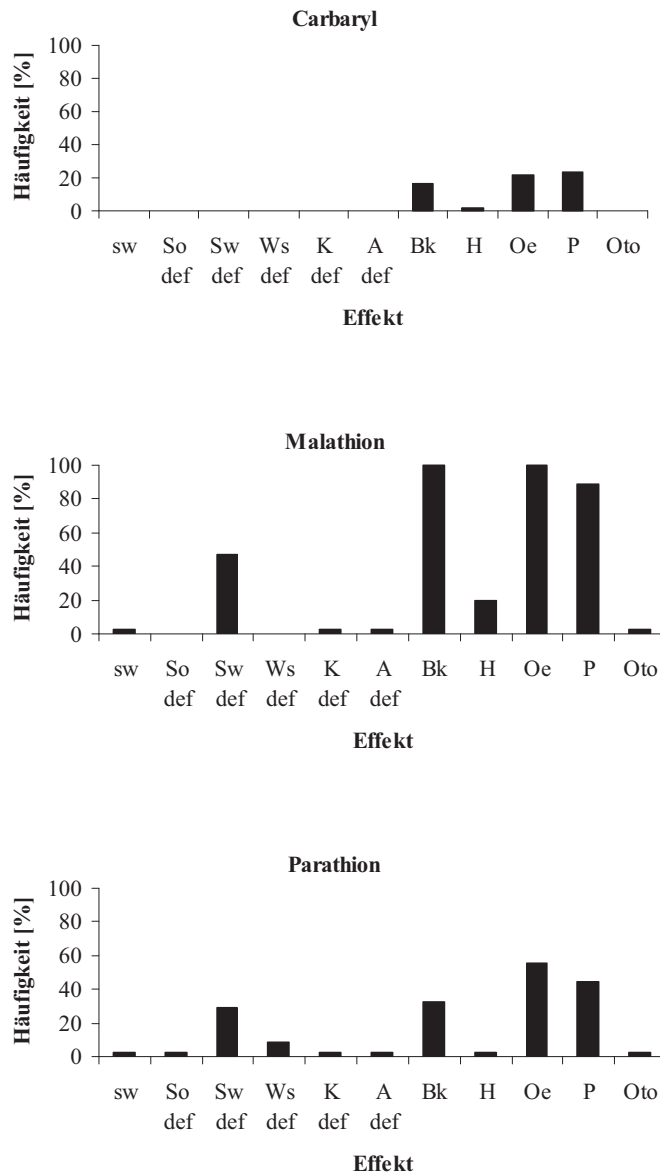


Abbildung 3-55: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den drei Acetylcholinesterasehemmern Carbaryl; Malathion; Parathion (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

Alle drei untersuchten Stoffe wirken als Acetylcholinesterase (AChE)-hemmer. Die AChE katalysiert die Spaltung des Neurotransmitters Acetylcholin in Cholin und Acetat. Diese Reaktion ist notwendig, damit sich die cholinergen Neuronen nach ihrer Aktivierung erholen können (Wishart, 2006). Carbaryl hemmt das Enzym dabei durch Carbamylation, ohne es jedoch strukturell zu verändern. Es kommt zu einer Anlagerung der Substanz im anionischen Zentrum des Enzyms und Carbamylierung des esteratischen Zentrums, was

schließlich die Hemmung der AChE zur Folge hat (Schulte, 1997). Die Wirkung ist reversibel, jedoch erfolgt die Decarbamylierung wesentlich langsamer als die Spaltung von Acetylcholin. Malathion und Parathion werden im Organismus metabolisch aktiviert und in die stärker toxischen Substanzen Malaoxon bzw. Paraoxon umgewandelt, die hemmend auf die Acetylcholinesterase wirken. Es wird eine langandauernde, irreversible Hemmung des Enzyms durch Phosphorylierung eines Serinrestes im esteratischen Zentrum erreicht (Forth et al, 2001). Die Hemmung der AChE bewirkt eine Akkumulation von Acetylcholin an den postsynaptischen Rezeptoren, was zu einer Störung der neuromuskulären Erregungsleitung mit Übererregung aller muskarin- und nikotinartigen cholinergen Rezeptoren, sowohl im ZNS als auch im Herzen, führt (Vetpharm, 2006). Die Rolle des Neurotransmitters Acetylcholin bei der Embryonalentwicklung ist noch nicht vollständig geklärt (Schulte, 1997).

3.1.10 Spasmolytika

3.1.10.1 Coffein

Nach mehreren Vorversuchen wurde Coffein in den Konzentrationen 2574,7 µmol/l, 3604,5 µmol/L, 5793 µmol/L, 8689,5 µmol/L sowie 13034,2 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 15 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen weder letale noch subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-121 zusammengefasst. Ab 3604,5 µmol/L zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Nach 24 bzw. 36 Stunden waren in den beiden höchsten Konzentrationen alle eingesetzten Embryonen koaguliert. In der niedrigsten untersuchten Konzentration trat dagegen keine Koagulation der Embryonen auf. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 4362,7 µmol/L (r^2 : 0,936; b: 6,390; LC_{10} : 2750,6 µmol/L) ermittelt.

Tabelle 3-121: Zusammenstellung der letalen Effekte von Coffein (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	2574,7	3604,5	5793,0	8689,5	13034,2
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	2/20	7/20	13/20	14/20
	12	-	-	3/20	8/20	18/20	17/20
	24	-	-	6/20	13/20	19/20	20/20
	36	-	-	6/20	13/20	19/20	20/20
	48	-	-	7/20	15/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	-	35	75	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-122 zusammenfassend dargestellt.

Es zeigte sich ab 3604,5 µmol/L nach 8 Stunden und 12 Stunden bei einzelnen Embryonen eine verzögerte Entwicklung. Es konnten Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter und die Somitenanlage sowie Deformationen an Augen und Kopf beobachtet werden. Es zeigten sich zudem bis in die niedrigste untersuchte Konzentration Deformationen an Schwanz und Wirbelsäule, eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme sowie eine reduzierte bzw. fehlende Pigmentierung. Ab Konzentration 3604,5 µmol/L waren konzentrationsabhängig zudem keine Otolithen angelegt.

Tabelle 3-122: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Coffein (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	2574,7	3604,5	5793,0	8689,5	13034,2
keine Gastrulation	8	-	-	3/18	7/13	3/7	1/6
	12	-	-	2/17	1/12	-	-
keine Schwanzablösung	24	-	-	1/14	6/7	1/1	koa
	36	-	-	-	6/7	1/1	koa
	48	-	-	-	2/5	koa	koa
keine oder deformierte Somiten	24	-	-	-	4/7	-	koa
	36	-	-	-	6/7	-	koa
	48	-	-	-	1/5	koa	koa
deformierter Augen	24	-	-	10/14	6/7	1/1	koa
	36	-	-	-	6/7	1/1	koa
	48	-	-	-	5/5	koa	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	6/7	-	koa
	36	-	-	-	6/7	-	koa
	48	-	-	2/13	5/5	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	9/14	7/7	1/1	koa
	36	-	1/20	14/14	7/7	1/1	koa
	48	-	17/20	13/13	5/5	koa	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	3/7	-	koa
	36	-	1/20	7/14	3/7	-	koa
	48	-	17/20	13/13	5/5	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	-	1/14	7/7	1/1	koa
	48	-	-	6/13	5/5	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	1/20	20/20	14/14	7/7	1/1	koa
	48	-	20/20	13/13	5/5	koa	koa
keine Pigmentierung	48	-	-	1/13	4/5	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	12/20	12/13	1/5	koa	koa
Dotterödem	48	-	20/20	12/13	2/5	koa	koa
Perikardödem	48	-	20/20	10/13	1/5	koa	koa
gesamt	48	-	20/20	12/13	2/5	koa	koa
Keine Otolithen	48	-	-	1/13	5/5	koa	koa

Wie Abbildung 3-56 zu entnehmen ist, zeigte sich bereits ab der niedrigsten untersuchten Konzentration eine deutliche Verringerung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle. Eine Berechnung einer NOEC war daher nicht möglich. Mittels Dunetts Test wurde eine LOEC von 2574,7 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

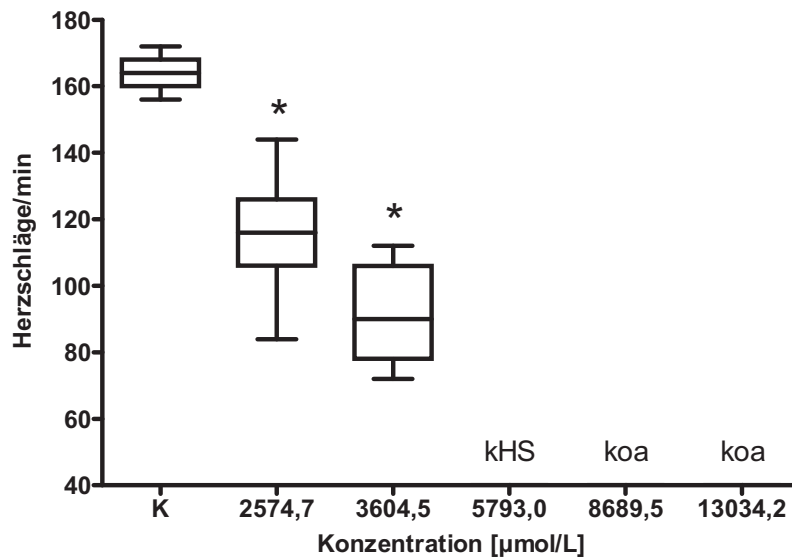


Abbildung 3-56: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Coffein-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

In einem Vorversuch wurden mittels Williams Test eine NOEC von 412 µmol/L und eine NOEC von 824 µmol/L ermittelt (Abbildung 3-57).

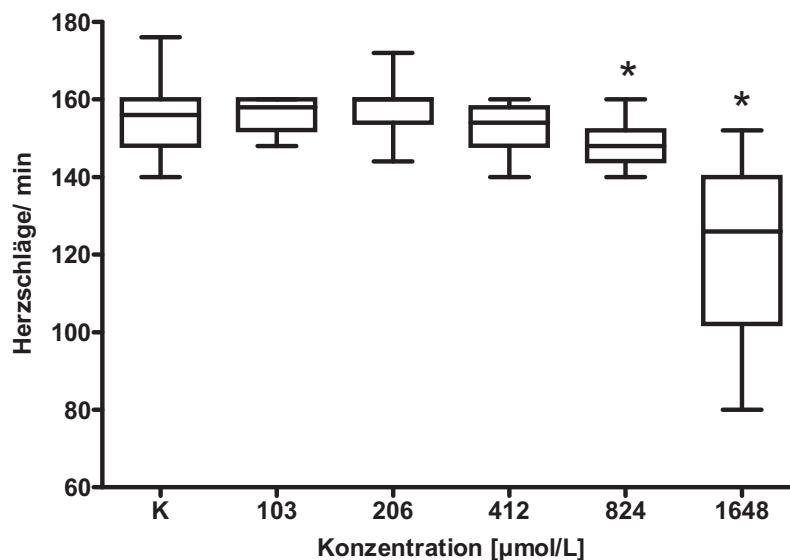


Abbildung 3-57: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Coffein-Konzentration im Vorversuch. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC₅₀, EC₅₀ sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-123 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-123: Zusammenfassung der berechneten Werte für Coffein.

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC ₅₀	48	4362,7
EC ₅₀ kein Herzschlag	48	3802,0
EC ₅₀ kein Blutkreislauf	48	aE
EC ₅₀ Pigmentierung	48	2498,5
EC ₅₀ Schwanzdeformation	48	2144,9
EC ₅₀ Schwanzablösung	48	6009,9
EC ₅₀ Wirbelsäulendeformation	48	2144,9
EC ₅₀ Somitenanlage	48	6318,3
EC ₅₀ Augendeformation	48	5384,8
EC ₅₀ Kopfdeformation	48	5207,4
EC ₅₀ Otolithen	48	4857,5
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	412,0
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	824,0

Vergleicht man die berechnete LC₅₀(48h) von 4362,7 µmol/L mit Angaben aus der Literatur für *Poecilia reticulata* (LC₅₀(96h): 1416,1 µmol/L; Merck, 2005), so zeigt sich, dass der Embryo weniger sensitiv reagiert hat. In der Literatur finden sich zwei Studien zur Untersuchung von Coffein an Embryonen von *Pimephales promelas*. Moore et al. (2008) ermittelten in Versuchen mit <24h alten Tieren eine LC₅₀(48h) von 515 µmol/L. DeYoung et al. (1996) ermittelten in ihren Untersuchungen eine LC₅₀ von 3707,5 µmol/L, die recht gut mit der, in den vorgestellten Versuchen ermittelten LC₅₀(48h) von 4362,7 µmol/L übereinstimmt. Sie berichten zudem von teratogenen Effekten in Form von Schwanz-, Wirbelsäulen-, Kopf- und Augendeformationen. Auch zeigten sich Defekte am Herz sowie Ödeme, Effekte die auch in der vorgestellten Untersuchung zu beobachten waren.

3.1.10.2 Theophyllin

Theophyllin wurde in den Konzentrationen 1429,4 µmol/L, 3287,6 µmol/L, 7561,4 µmol/L, 17391,3 µmol/l sowie 40000 µmol/L untersucht, wobei die höchste Konzentration kurz unterhalb der Löslichkeitsgrenze der Substanz lag.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 44 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 5,3% subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-124 zusammengefasst. Im untersuchten Konzentrationsbereich koagulierten nur zwei Embryonen in der höchsten untersuchten Konzentration, so dass keine Berechnung der $LC_{50}(48h)$ möglich war. Bezieht man jedoch alle vier, ursprünglich durch Schulte und Nagel (1994) als letal definierten Endpunkte in die Berechnung mit ein (2.3), so ergibt sich eine $LC_{50}(48h)$ von 20881,9 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 1,000; b: 12,924; LC_{10} :14117,6 $\mu\text{mol/L}$).

Tabelle 3-124: Zusammenstellung der letalen Effekte von Theophyllin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	1429,4	3287,6	7561,4	17391,3	40000
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	1/20	-	-	-	-	2/20
	36	1/20	-	-	-	-	2/20
	48	1/20	-	-	-	-	2/20
gesamt [%]	48	5	-	-	-	-	10

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-125 zusammengefasst. In der höchsten untersuchten Konzentration zeigten nach 8 bzw. 12 Stunden 10% bzw. 5% der Embryonen keine Gastrulation. Auch waren Effekte auf Schwanzablösung und Somiten zu beobachten. Es zeigten sich außerdem Deformationen an Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule. Bis in die niedrigste untersuchte Konzentration waren eine Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme zu beobachten. Die Pigmentierung war ab 7561,4 $\mu\text{mol/L}$ konzentrationsabhängig reduziert bzw. nicht angelegt. Deutliche Effekte auf die Otolithen (>10%) waren erst in der höchsten untersuchten Konzentration zu beobachten.

Tabelle 3-125: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Theophyllin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	1429,4	3287,6	7561,4	17391,3	40000
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	-	2/20
	12	-	-	-	-	-	1/20
keine Schwanzablösung	24	-	1/20	-	-	-	10/18
	36	-	1/20	-	-	-	7/18
	48	-	1/20	-	-	-	6/18
keine oder deformierte Somitenanlage	24	-	1/20	-	-	-	6/18
	36	-	1/20	-	-	-	6/18
	48	-	1/20	-	-	-	6/18
keine/ deformierte Augenanlage	24	-	1/20	-	-	11/20	18/18
	36	-	1/20	-	-	-	14/18
	48	-	1/20	-	-	1/20	10/18
deformierter Kopf	24	-	1/20	-	-	-	7/18
	36	-	1/20	-	-	-	6/18
	48	-	1/20	-	15/20	19/20	17/18
deformierter Schwanz	24	-	1/20	-	-	-	18/18
	36	-	1/20	-	-	19/20	18/18
	48	-	1/20	2/20	20/20	20/20	18/18
deformierte Wirbelsäule	24	-	1/20	-	-	-	6/18
	36	-	1/20	-	-	-	7/18
	48	-	1/20	-	20/20	20/20	18/18
kein Herzschlag	36	-	1/20	-	-	-	18/18
	48	-	1/20	-	1/20	6/20	18/18
kein Blutkreislauf	36	-	3/20	7/20	20/20	20/20	18/18
	48	-	2/20	10/20	20/20	20/20	18/18
keine Pigmentierung	48	1/19	1/20	-	-	1/20	17/18
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	2/20	16/20	1/18
Dotterödem	48	-	1/20	13/20	20/20	12/20	-
Perikardödem	48	-	-	5/20	19/20	13/20	1/18
gesamt	48	-	1/20	14/20	20/20	17/20	1/18
keine Otolithen	48	-	1/20	-	-	1/20	17/18

Wie Abbildung 3-58 zu entnehmen ist, zeigte sich ab 3287,6 $\mu\text{mol/L}$ im Vergleich zu den Kontrollembryonen eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Es wurden eine NOEC von 1429,4 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 3287,6 $\mu\text{mol/L}$ mittels Dunetts-Test bestimmt.

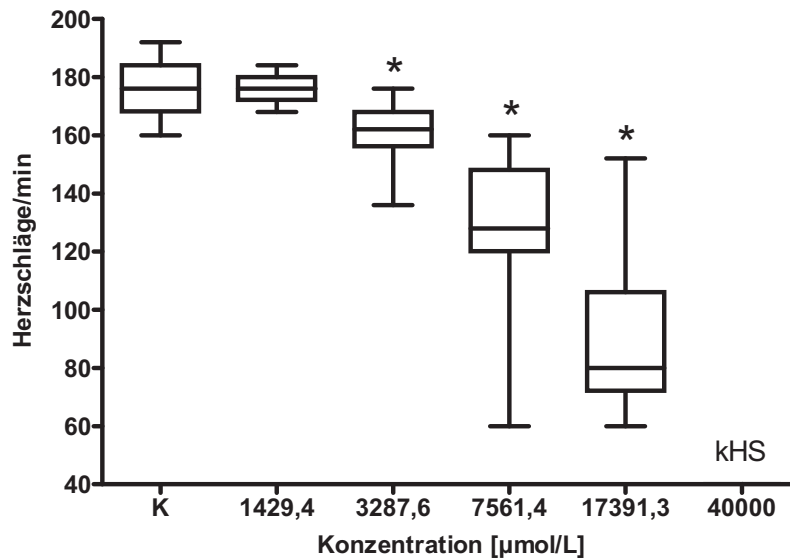


Abbildung 3-58: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Theophyllin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-126 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3-126: Zusammenfassung der berechneten Werte für Theophyllin (n.d.: nicht bestimmbar aus mathematischen Gründen).

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	20881,9
EC_{50} kein Herzschlag	48	20802,8
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	3149,2
EC_{50} Pigmentierung	48	12695,8
EC_{50} Schwanzdeformation	48	4561,9
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	4985,9
EC_{50} Augendeformation	48	37444,9
EC_{50} Kopfdeformation	48	6063,93
EC_{50} Otolithen	48	26564,7
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	1429,4
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	3287,6

Zeller (1995) beschreibt in ihren Untersuchungen ähnliche Effekte von Theophyllin auf die Embryonen des Zebrafischblings. Auch in ihren Versuchen traten eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems, Ödeme, Deformationen sowie eine reduzierte Pigmentierung auf. Sie beschreibt zudem eine Beeinflussung der Spontanbewegungsrate der

Embryonen bis hin zu Krampfanfällen. Diese Effekte konnten in der vorgestellten Untersuchung nicht beobachtet werden. In ihren Untersuchungen zeigte sich zudem ab einer Konzentration von 31,3 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Erhöhung, ab 5120 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Im vorgestellten Versuch war dies ab 3300 $\mu\text{mol/L}$ der Fall.

Im Tierversuch zeigten sich nach i.p.-Gabe der Substanz teratogene Effekte an Mäusen in Form von Gaumenspalten und Missbildungen der Zehen. Es werden auch kardiovaskuläre Missbildungen diskutiert. Auch in den vorgestellten Untersuchungen zeigten sich massive Deformationen an Kopf, Schwanz, Augen und Wirbelsäule der exponierten Embryonen.

Es werden eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben, die bei der Einnahme durch den Menschen auftreten können (Altana Pharma, 2004). Von diesen Effekten zeigten sich beim Embryo Arrhythmien und Tachykardie.

3.1.10.3 Spasmolytika- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden Coffein und Theophyllin als Einzelstoffe untersucht. Die Toxizität von Coffein war in den vorgestellten Untersuchungen mit einer $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 4362,7 $\mu\text{mol/L}$ größer als die von Theophyllin. Theophyllin wurde bis zur Löslichkeitsgrenze untersucht. In diesem Konzentrationsbereich koagulierte nur zwei Embryonen. Bezieht man den Endpunkt „fehlender Herzschlag“ als letalen Parameter mit in die Auswertung ein so ergibt sich eine $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 20881,9 $\mu\text{mol/L}$.

Es zeigten sich bei beiden Substanzen vergleichbare subletale Effekte in Form von Deformationen, einer Beeinflussung des Blutkreislaufs, der Pigmentierung sowie des Herzschlages. Auch konnten bei beiden Ödeme beobachtet werden. Bei beiden Substanzen fehlten Embryonen die Otolithen (Abbildung 3-59).

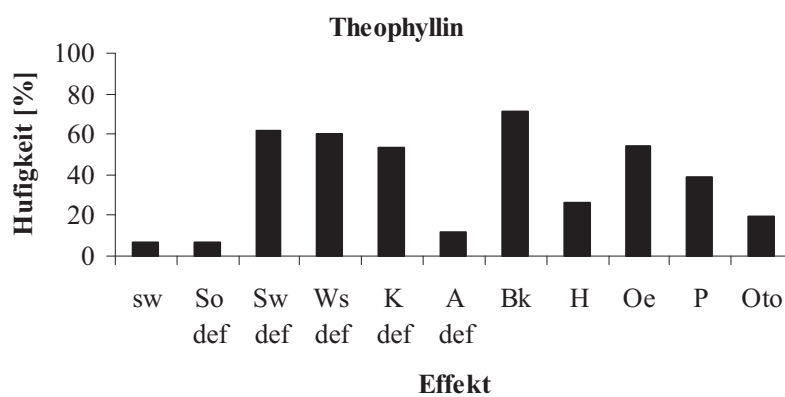
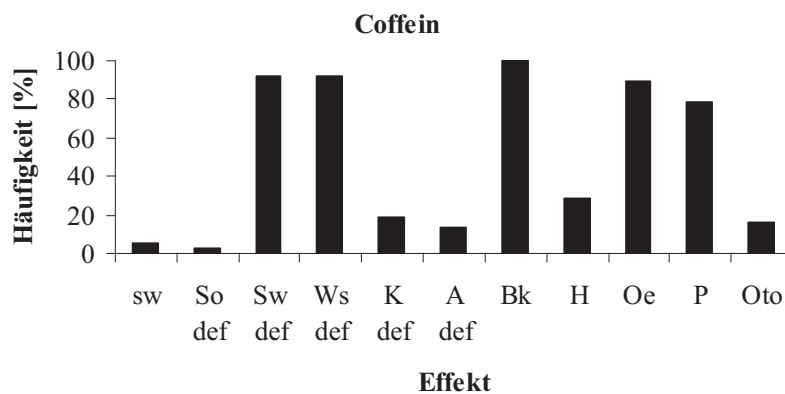


Abbildung 3-59: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den beiden Spasmolytika Coffein und Theophyllin (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

In der Literatur werden für beide Substanzen ähnliche Wirkmechanismen beschrieben. Es werden drei verschiedene, konzentrationsabhängige Hauptwirkmechanismen diskutiert (Forth et al., 2001). Sie blockieren zum einen Adenosin-Rezeptoren und heben damit deren dämpfenden Einfluss auf Herz und ZNS auf. Zum anderen wirken sie als Phosphodiesterase-Hemmstoffe und inhibieren den intrazellulären Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen. Aus diesem resultiert eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche verschiedene Phosphorylierungsreaktionen katalysiert, darunter auch die Phosphorylierung von Calciumkanalproteinen des Herzens, deren Öffnungszeit sich daraufhin verlängert. Die Folge ist ein vermehrter Calciumeinstrom in die Zelle nach Kanalaktivierung. Diese vermehrte intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflusst wiederum alle Calcium-gesteuerten Prozesse am Herzen, wie Herzfrequenz und Kontraktionskraft (Zeller,

1995). Beide Mechanismen führen zu einer positiven inotropen und chronotropen Wirkung. Zudem wird eine, von der Phosphodiesterase-Inhibition unabhängige, Beeinflussung des zellulären Calciumhaushaltes als weitere Wirkmechanismen diskutiert, einhergehend mit der Kontraktion von glatter und Skelettmuskulatur.

Im Embryotest wurde jedoch ein negativer Einfluss auf die Herzschlagfrequenz beobachtet, der auf die hohen eingesetzten Konzentrationen zurückzuführen ist. Für einen ähnlichen Wirkmechanismus der beiden untersuchten Substanzen sprechen die ähnlichen subletalen Effekte (Tabelle 3-122, Tabelle 3-125).

3.1.11 Zytostatika

3.1.11.1 Cyclophosphamid

Cyclophosphamid wurde in den Konzentrationen 3583 µmol/L, 7166 µmol/L, 14332 µmol/L, 28664 µmol/l sowie 57327 µmol/L untersucht.

Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. In 57327 µmol/L lag zu Testbeginn der pH unter 5. Es war zudem in allen untersuchten Konzentrationen ein Abfall des pH-Wertes zwischen Testbeginn und Testende zu beobachten. Eine Beeinträchtigung der Embryonen durch die niedrigen pH-Werte (<4,0) ist daher nicht auszuschließen. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 16 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an den Kontrollembryonen bei maximal 5% der eingesetzten Embryonen letale und bei maximal 10,5% subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 3-127 zusammengefasst. Es zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Nach 24 Stunden waren in den beiden höchsten Konzentrationen alle eingesetzten Embryonen koaguliert. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 11292,1 µmol/L (r^2 : 0,992; b: 15,647; LC₁₀: 9353,1 µmol/L) ermittelt.

Tabelle 3-127: Zusammenstellung der letalen Effekte von Cyclophosphamid (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]					
		K	3583	7166	14332	28664	57327
Koagulation	4	-	-	-	-	-	18/18
	8	-	-	-	-	8/18	18/18
	12	-	-	-	-	8/18	18/18
	24	-	1/20	-	19/20	18/18	18/18
	36	-	1/20	-	19/20	18/18	18/18
	48	1/20	1/20	-	19/20	18/18	18/18
gesamt [%]	48	5	5	-	95	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-128 dargestellt. Es zeigten sich nur vereinzelte subletale Effekte. In der niedrigsten untersuchten Konzentration (3583 µmol/L) hatten nach 48 Stunden zwei Embryonen jeweils drei Otolithen pro Sacculus angelegt, in 7166 µmol/L ein Embryo. Ein anderer zeigte in dieser Konzentration nach 48 Stunden Deformationen an Schwanz und Wirbelsäule, ein dritter ein Perikardödem. In der Konzentration 14332 µmol/L zeigte ein Embryo keinen Blutkreislauf

und hatte sowohl am Dotter als auch am Perikard ein Ödem ausgebildet. Eine Berechnung von Effektkonzentrationen war aufgrund der wenigen beobachteten Effekte nicht möglich.

Tabelle 3-128: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Cyclophosphamid (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koagulierte; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	3583	7166	14332	28664	57327
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	koa	koa
	36	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	1/20	-	koa	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	koa	koa
	36	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	1/20	-	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	1/1	koa	koa
Dotterödem	48	2/19	-	-	1/1	koa	koa
Perikardödem	48	1/19	-	1/20	1/1	koa	koa
Schwanzödem	48	1/19	-	-	-	koa	koa
gesamt	48	2/19	-	1/20	1/1	koa	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	2/19	1/20	-	koa	koa

Wie Abbildung 3-60 zu entnehmen ist, zeigte sich ab der Konzentration 7166 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Es wurden eine NOEC von 3583 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 7166 $\mu\text{mol/L}$ mittels Dunetts-Test bestimmt.

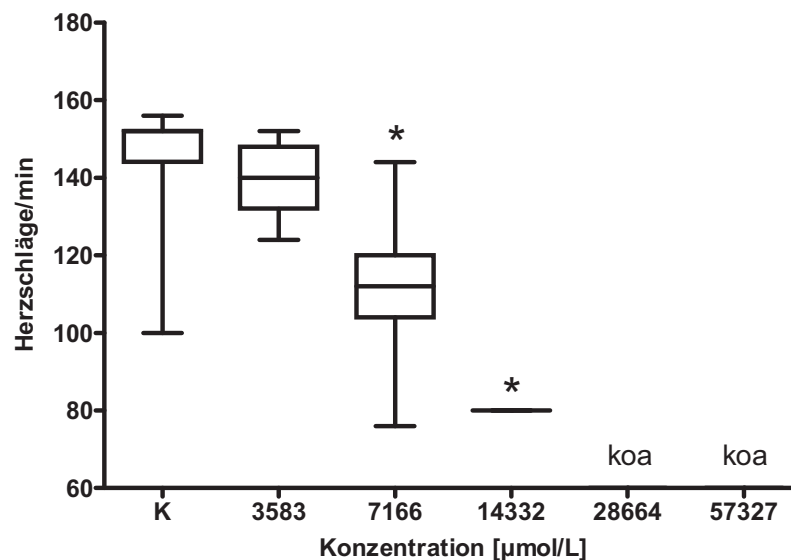


Abbildung 3-60: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Cyclophosphamid-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Ver-

gleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die ermittelte NOEC von $3583 \mu\text{mol/L}$ liegt unter dem Wert der in der Literatur für *Salmo gairdneri* (NOEC(96h) $\rightarrow 3536 \mu\text{mol/L}$) angegeben wird. Das würde dafür sprechen, dass die Embryonen sensitiver auf diese Substanz reagieren als die adulten Tiere.

Da nur wenige subletale Effekte aufgetreten sind, ist ein Vergleich mit Literaturdaten nur schwer möglich. Von den vielfältigen, in der Literatur beschriebenen Nebenwirkungen beim Menschen (Endoxan®; Baxter, 2003) konnten einige wenige ansatzweise auch beim Fisch beobachtet werden. So wird von einer dosisabhängigen Myelosuppression, d.h. der Schädigung des Rückenmarks mit einer verminderten Bildung von Blutzellen sowie von Kardiomyopathie, d.h. einer Schädigung des Herzmuskels berichtet. Beim Embryo zeigte sich zum einen eine Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems (Tabelle 3-128). Zum anderen auch eine Reduktion der Herzschlagfrequenz (Abbildung 3-60). Unklar ist jedoch, ob dies über die selben Mechanismen wie beim Säuger erfolgt ist.

Cyclophosphamid wirkt im Tierversuch außerdem mutagen, karzinogen und teratogen (Baxter, 2003). Im vorgestellten Versuch konnten bei einem einzelnen Embryo Deformationen an Schwanz und Wirbelsäule beobachtet werden. Unklar ist, ob dies auf die Wirkung der Substanz oder auf eine gestörte Entwicklung zurückzuführen ist.

Busquet (2008) hat Cyclophosphamid in *mDarT* untersucht. Dabei wird der Embryotest mit MAS (exogenous mammalian metabolic activation system) gekoppelt. Er konnte in seinen Untersuchungen deutliche Unterschiede zwischen Cyclophosphamid und Cyclophosphamid nach metabolischer Aktivierung zeigen. Nach metabolischer Aktivierung traten konzentrationsabhängig mehr letale und subletale, d.h. v.a. teratogene Effekte auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Embryo innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Befruchtung nicht in der Lage ist, Cyclophosphamid zu metabolisieren.

3.1.11.2 Ifosfamid

Ifosfamid wurde in den Konzentrationen $4787,4 \mu\text{mol/L}$, $9575 \mu\text{mol/L}$, $19150 \mu\text{mol/L}$, $38300 \mu\text{mol/L}$ sowie $76600 \mu\text{mol/L}$ untersucht.

Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind im Anhang C in Tabelle 26 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da nach 48 Stunden an maximal fünf Prozent der eingesetzten Kontrollembryonen letale und keine subletalen Effekte zu beobachten waren.

Die beobachteten letalen Effekte sind in Tabelle 3-129 zusammenfassend dargestellt. Erst in der höchsten untersuchten Konzentration zeigte sich zeitabhängig die Koagulation der Embryonen. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von $54163,7 \mu\text{mol/L}$ ($r^2: 1,000$; $b: 20,531$; $LC_{10}: 46920 \mu\text{mol/L}$) ermittelt.

Tabelle 3-129: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ifosfamid (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	4787,4	9575	19150	38300	76600
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	1/20	-	-	-	-	3/20
	36	1/20	-	-	-	-	9/20
	48	1/20	-	-	-	-	20/20
gesamt [%]	48	5	-	-	-	-	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 3-130 zusammengefasst. Nur in der höchsten untersuchten Konzentration von 76600 $\mu\text{mol/L}$ konnten nach 24 und 36 Stunden eine gelbliche Verfärbung der Embryonen, fehlende Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Augen und Schwanz beobachtet werden. In dieser Konzentration hatten zudem nach 36 Stunden alle eingesetzten Embryonen keinen Herzschlag ausgebildet, nach 48 Stunden alle Embryonen in 38300 $\mu\text{mol/L}$. Es zeigte sich außerdem eine konzentrationsabhängige Beeinträchtigung der Entwicklung des Blutkreislauf und der Pigmentierung sowie eine Zunahme von Ödemen ab 9575 $\mu\text{mol/L}$. In 38300 $\mu\text{mol/L}$ hatten nach 48 Stunden acht Embryonen drei Otolithen pro Sacculus angelegt.

Tabelle 3-130: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ifosfamid (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	4787,4	9575	19150	38300	76600
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	-	4/17
	36	-	-	-	-	-	1/11
	48	-	-	-	-	-	koa
fehlende / deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	-	16/17
	36	-	-	-	-	-	10/11
	48	-	-	-	-	-	koa
Schwanzdeformation	24	-	-	-	-	-	8/17
	36	-	-	-	-	-	3/11
	48	-	-	-	-	-	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	11/11
	48	-	-	-	-	19/19	koa
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	19/19	11/11
	48	-	-	1/20	1/20	19/19	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	1/20	1/20	18/19	koa
fehlende Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	koa
Dotterödem	48	-	-	1/20	3/20	19/19	koa
Perikardödem	48	-	-	1/20	3/20	19/19	koa
gesamt	48	-	-	1/20	3/20	19/19	koa
keine/ deformierte Otolithen	48	-	-	-	-	8/19	koa

Wie Abbildung 3-61 zu entnehmen ist, zeigte sich ab 19150 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Es wurden eine NOEC von 9575 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 19150 $\mu\text{mol/L}$ mittels Dunetts-Test bestimmt.

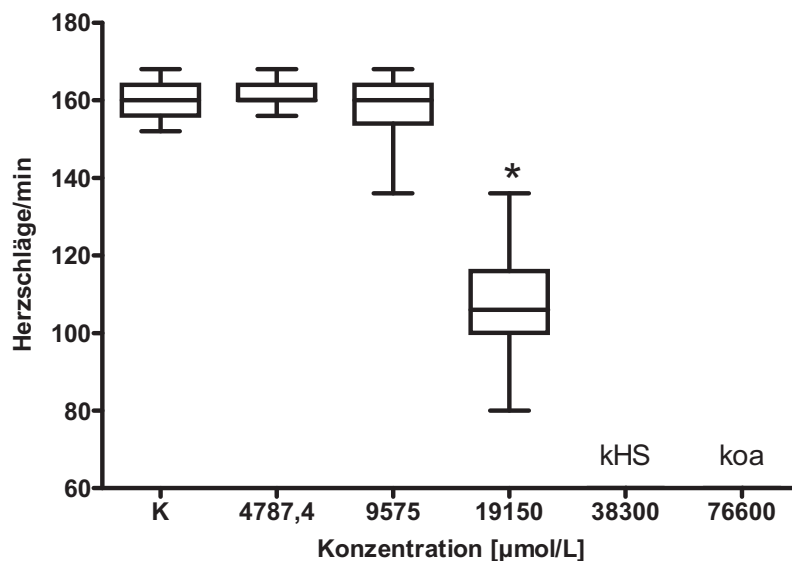


Abbildung 3-61: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Ifosfamid-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 3-131 zusammengestellt.

Tabelle 3-131: Zusammenfassung der berechneten Werte für Ifosfamid.

Effekt	Zeit [h]	[µmol/L]
LC_{50}	48	54163,7
EC_{50} kein Herzschlag	48	27081,9
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	27402,8
EC_{50} Ödeme	48	22794,0
EC_{50} Otolithen	48	40313,7
NOEC (Herzschlag)	48	9574,9
LOEC (Herzschlag)	48	19149,8

Vergleicht man die ermittelte $LC_{50}(48h)$ von 54163,7 µmol/L sowie die NOEC(48h) von 9575 µmol/L mit Literaturdaten für *Salmo gairdneri* aus einem 96h-Akutttest (NOEC(96h): 2125 µmol/L; $LC_{50}(96h)$: > 3830 µmol/L), so zeigt sich, dass das adulte Tier sensitiver reagiert hat als der Embryo.

In der Literatur werden für den Menschen eine Reihe von Nebenwirkungen beschrieben. Neben Effekten, die am Embryo nicht zu erfassen sind z.B. Haarausfall, endokrine und

Stoffwechselstörungen, nephrotoxische Effekte durch den Metaboliten Acrolein oder Effekte auf das ZNS, konnten andere Effekte dagegen beobachtet werden. So wird von einer dosisabhängigen Myelosuppression, d.h. der Schädigung des Rückenmarks mit einer verminderten Bildung von Blutzellen sowie von Funktionsstörungen des Herzens berichtet (Baxter, 2004). Beim Embryo zeigte sich zum einen eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems (Tabelle 3-130). Zum anderen auch eine Reduktion der Herzschlagfrequenz (Abbildung 3-61)). Unklar ist jedoch, ob dies über die selben Mechanismen wie beim Säuger erfolgt ist.

Ifosfamid gehört zu den genotoxischen Substanzen und besitzt ein entsprechendes mutagenes Potential. Im Tierversuch mit Mäusen und Ratten konnte eine kanzerogene Wirkung der Substanz gezeigt werden. Auch konnten in Versuchen mit Ratten, Mäusen und Kaninchen bei Dosen von 11,5 und 28,7 $\mu\text{mol/kg}$ embryotoxische und teratogene Effekte hervorgerufen werden (Baxter, 2004). Auch beim Fischembryo zeigten sich nach 24 und 36 Stunden teratogene Effekte in Form von Schwanzdeformationen, jedoch erst ab einer Konzentration von 76600 $\mu\text{mol/L}$. Zudem war die Entwicklung der exponierten Embryonen in dieser Konzentration im Vergleich zur Kontrolle verzögert. Es waren jedoch sehr hohe Konzentrationen der Substanz notwendig, um an den Embryonen letale und subletale Effekte hervorzurufen. Da Ifosfamid und Cyclophosphamid strukturell ähnlich sind und beide im Säuger einer metabolischen Aktivierung unterliegen, ist auch bei Ifosfamid davon auszugehen, dass der Embryo innerhalb der 48-stündigen Expositionsdauer nicht in der Lage war, den Stoff zu metabolisieren. Busquet (2008) konnte für Cyclophosphamid in *mDarT* deutliche Unterschiede zwischen Cyclophosphamid und Cyclophosphamid nach metabolischer Aktivierung in MAS zeigen. Nach metabolischer Aktivierung traten konzentrationsabhängig mehr letale und subletale, d.h. v.a. teratogene Effekte auf.

3.1.11.3 Zytostatika- zusammenfassende Betrachtung

Es wurden die beiden Zytostatika Ifosfamid und Cyclophosphamid als Einzelstoffe untersucht.

Im durchgeführten Versuch erwies sich Cyclophosphamid mit einer $\text{LC}_{50}(48\text{h})$ von 11292,1 $\mu\text{mol/L}$ als toxischer als Ifosfamid ($\text{LC}_{50}(48\text{h})$: 54163,7 $\mu\text{mol/L}$). Unklar ist, ob die Toxizität von Cyclophosphamid pH-abhängig ist.

Im Versuch mit Ifosfamid konnten im untersuchten Konzentrationsbereich deutlichere subletale Effekte beobachtet werden als bei Cyclophosphamid (Abbildung 3-62). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, zeigten sich nach 48 Stunden bei beiden Stoffen Effekte auf das Blutkreislaufsystem und die Entwicklung der Otolithen sowie Ödeme. Bei Cyclophosphamid traten zudem Deformationen an Schwanz und Wirbelsäule auf; bei Ifosfamid eine Beeinträchtigung der Entwicklung der Pigmentierung sowie fehlender Herzschlag. Bei beiden Stoffen konnte zudem eine konzentrationsabhängige Reduktion der Herzschlagfrequenz beobachtet werden (Abbildung 3-60 und Abbildung 3-61).

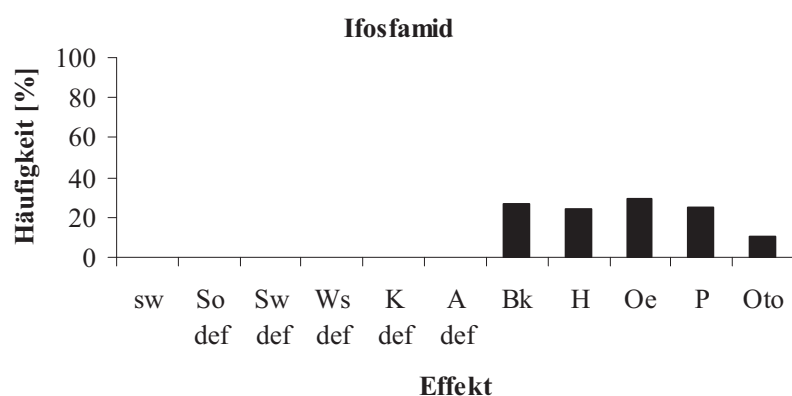
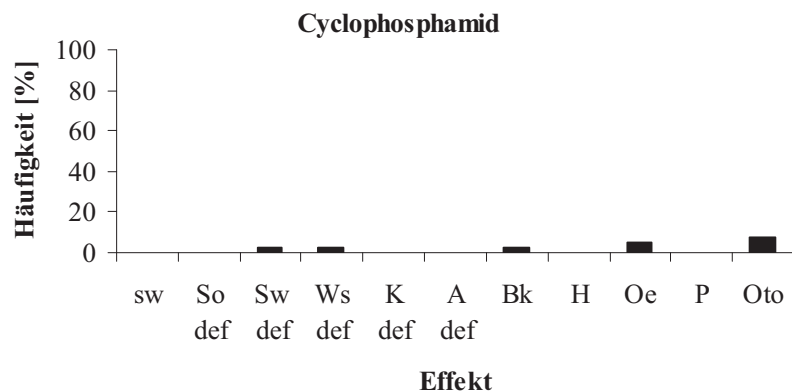


Abbildung 3-62: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den beiden Zytostatika Cyclophosphamid und Ifosfamid (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

Beide Stoffe finden Anwendung in der Chemotherapie und sind Stickstoff-Lost-Derivate aus der Gruppe der Oxazaphosphorine, die sich nur durch die räumliche Anordnung der Chlorethylgruppen unterscheiden (2.8). Für beide werden ähnliche Wirkmechanismen in der Literatur beschrieben. Im Organismus unterliegen beide einem Aktivierungsmechanismus, d.h. sie selbst besitzen keine alkylierende Aktivität, sondern werden, ähnlich wie die beschriebenen Pflanzenschutzmittel, metabolisch aktiviert (Prodrug, Forth et al., 2001). Sie werden in der Leber über mikrosomale Enzyme aus der CYP450-Familie zu ihren aktiven Metaboliten umgesetzt (Baxter, 2003, 2004; Forth et al., 2001). Der alkylierende Metabolit beider Substanzen interagiert mit der DNA, bei Ifosfamid v.a. mit den Phosphordiesterbrücken, wodurch es sowohl zu Strangbrüchen als auch zu Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges und auch zu DNA-Protein-Quervernetzungen (cross-links) kommen kann. Durch die kovalente Quervernetzung der DNA-Stränge werden Replikation und Transkription in allen sich teilenden Zellen gehemmt. Dies führt zum Funktionsverlust und schließlich zum Zelltod. Obwohl

sowohl Cyclophosphamid als auch Ifosfamid nicht zellzyklusphasenspezifisch wirken, reagieren Zellen in der späten G1- und S-Phase am sensitivsten. Im Zellzyklus wird eine Verlangsamung der G2-Phase-Passage erreicht. (Baxter, 2003, 2004). Die zytotoxische Wirkung der Substanzen ist dabei in rasch proliferierenden Zellen am größten (Forth et al., 2001).

Busquet (2008) konnte für Cyclophosphamid in *mDarT* (Embryotest gekoppelt mit MAS) deutliche Unterschiede zwischen Cyclophosphamid und Cyclophosphamid nach metabolischer Aktivierung zeigen. Nach metabolischer Aktivierung traten konzentrationsabhängig mehr letale und subletale, d.h. v.a. teratogene Effekte auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Embryo innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Befruchtung nicht in der Lage ist, Cyclophosphamid (und damit auch Ifosfamid) zu metabolisieren.

3.2 Zusammenfassung der Einzelstoffexperimente

Zweiunddreißig Arzneimittel und drei Pflanzenschutzmittel wurden als Einzelstoffe mit dem Embryotest mit dem Zebrafisch *Danio rerio* (*DarT*) untersucht. Nachfolgend sind die, in den Untersuchungen mit dem Embryotest gewonnenen Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Die ermittelten letalen Konzentrationen und die beobachteten subletalen Effekte werden nachfolgend dargestellt.

3.2.1.1 Letale Effekte

Es zeigten sich bei den Untersuchungen der Einzelstoffe große Unterschiede in der Toxizität gegenüber den Embryonen. In Tabelle 3-132 sind die berechneten $LC_{50}(48h)$ -Werte aufgeführt. Als am toxischsten erwies sich 17- α -Ethinylöstradiol mit einer $LC_{50}(48h)$ von 5,4 $\mu\text{mol/L}$. Am wenigsten toxisch war Terbutalin, bei dem bis zu einer Konzentration von 72913,9 $\mu\text{mol/L}$ nur wenige Embryonen koagulierten und daher keine $LC_{50}(48h)$ berechnet werden konnte.

Daten aus toxikologischen Untersuchungen an Ratten und Mäusen sind in der Literatur für fast alle getesteten Substanzen vorhanden. Um zu überprüfen, ob sich ein ähnliches Muster im Nager und im Fisch bezüglich der Giftigkeit zeigt, wurden anhand der LC_{50} - und $\log K_{ow}$ -Werte der Einzelstoffe LD_{50}^* -Werte ermittelt (2.9). Es lässt sich feststellen, dass der Embryo bei Oxytetracyclin, Valproinsäure, EE_2 , Clofibrinsäure (ohne pH-Einstellung) und Carbaryl empfindlicher reagiert als der Nager. Bei ASS, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Paracetamol, Chloramphenicol, Bisoprolol, Metoprolol, Propranolol, Clenbuterol, Salbutamol, Tamoxifen, Verapamil, Malathion, Coffein sowie Cyclophosphamid und Ifosfamid war der Nager sensiti- ver (Tabelle 3-132). Für Acetylcystein sind die beiden Werte nahezu identisch LD_{50}^* : 30228,8 $\mu\text{mol/kg}$; $LD_{50}(\text{oral, Ratte})$: 30962,6 $\mu\text{mol/kg}$.

Für die Analgetika, Antibiotika, β -Blocker und Pestizide ergibt sich ein ähnliches Muster bei Fisch und Nager. Diclofenac ist bei den Analgetika, Oxytetracyclin bei den Anti- biotika, Propranolol bei den β -Blockern und Malathion bei den Pestiziden in beiden Modellen die giftigste Substanz. Für die übrigen Stoffgruppen lassen sich keine entsprechenden Aussa- gen ableiten.

Tabelle 3-132: Zusammenfassung der Einzelstoffdaten (k.A.: keine Angabe; -: keine Berechnung der LD₅₀* möglich, da keine Angaben zum logK_{ow} der Substanz in der Literatur zu finden waren; *: da keine Berechnung einer LC₅₀ möglich war, kann auch keine LD₅₀* angegeben werden).

	LC ₅₀ (48h); [μmol/L]	LD ₅₀ *(48h); [μmol/kg]	LD ₅₀ (oral, Nager ¹) [μmol/kg]
Analgetika			
ASS	345,5	1458,6	6239,2
Diclofenac	192,6	762,9	166,6
Ibuprofen	200,5	-	2785,9
Naproxen	237,1	-	983,2
Paracetamol	12071,6	24761,4	12857,1
Antibiotika			
Chloramphenicol	10089,8	40394,5	7737,5
Clarithromycin	>13,4	*	>8021,9
Erythromycin	>13,6	*	509,6
Oxytetrazyklin	1019,2 / 2846,1	333,2 / 930,5	7244,9 – 14489,8
Roxithromycin	>12,0	*	k.A.
Sulfamethoxazol	>3158,2	*	k.A.
Trimethoprim	>1033,3	*	9520,5
Antidote			
ACC	1071,1 / 51024,8	634,6 / 30228,8	30962,6
Atropin	22543,6	-	107,9
Antiepileptika			
Carbamazepin	>846,5	*	8281,8
Valproinsäure	91,5	2023,4	4646,0
β-Blocker			
Bisoprolol	19134,6	166260,6	1455,1
Metoprolol	10656,4	110904,8	4512,3
Propranolol	368,1	7719,1	976,9
β-Sympathomimetika			
Clenbuterol	4746,7	124394,7	1004,1
Salbutamol	47280,1	57041,2	>8670,0
Terbutalin	>72913,9	*	31717,1
gemischte Stoffgruppe			
17-α-Ethinylöstradiol	5,4	556,5	3282,7
Tamoxifen	56,8	54393,7	2111,1
Verapamil	585	92184,1	325,9
Lipid-Senker			
Bezafibrat	>276,4	*	2990,6
Clofibrinsäure	185,4 / >2796,0	3386,7 / *	4179,9
Fenofibrat	>207,9	*	>5542,8
Pflanzenschutzmittel			
Carbaryl	39,4	575,9	2683,9
Malathion	25,5	372,7	4,2 – 8,5
Parathion	32,5		22,8
Spasmolytika			
Coffein	4362,7	4834,9	653,9 – 705,5
Theophyllin	>40000	*	1248,8
Zytostatika			
Cyclophosphamid	11292,1	26309,0	1225,4
Ifosfamid	54163,7	168077,0	547,7

¹ Ratte oder Maus; Daten aus der Literatur entnommen (2.8)

Ordnet man die untersuchten Substanzen anhand der ermittelten LC₅₀(48h)-Werte entsprechend dem Schema nach der EU Direktive 93/67/ EEC (Commission of the European Communities, 1996) ein, so ist demnach keine der untersuchten Substanzen als „sehr giftig“ einzustufen, vier Substanzen als „giftig“ und acht Stoffe als „schädlich“. Für die meisten Substanzen wurden LC₅₀(48h)-Werte von über 100 mg/L berechnet. Für zehn Stoffe lag die LC₅₀(48h) über der Löslichkeitsgrenze. Zu beachten ist, dass sich die Angaben auf mg/L beziehen (Tabelle 3-133).

Tabelle 3-133: Einordnung der untersuchten Substanzen anhand der ermittelten LC₅₀(48h)-Werte (aEP: LC₅₀ ermittelt mit allen 4 als letal definierten Endpunkten; Hb: LC₅₀ ermittelt mit dem Parameter „fehlender Herzschlag“; koa: LC₅₀ ermittelt nur mit den koagulierten Embryonen; o. pH: ohne Einstellung des pH-Wertes; m. pH: mit Einstellung des pH-Wertes)

Einordnung	Substanz
very toxic (LC ₅₀ : <1 mg/L)	-
toxic (LC ₅₀ : 1-10 mg/L)	17- α -Ethinylöstradiol, Carbaryl, Malathion, Parathion
harmful (LC ₅₀ : 10- 100 mg/L)	ASS, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Propranolol, Tamoxifen, Valproinsäure, Clofibrinsäure (o. pH)
not classified (LC ₅₀ : >100 mg/L)	ACC (o. pH), Atropin, Bisoprolol, Carbamazepin, Chloramphenicol, Clenbuterol, Coffein, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Metoprolol, Oxytetrazyklin, Paracetamol, Salbutamol, Theophyllin, Verapamil
über Löslichkeitsgrenze	Clarithromycin, Erythromycin, Roxithromycin, Sulfamethoxazol, Trimethoprim, Carbamazepin, Terbutalin, Bezafibrat, Clofibrinsäure (m. pH), Fenofibrat, Theophyllin (koa)

Für die elf untersuchten Substanzen Clarithromycin, Erythromycin, Roxithromycin, Sulfamethoxazol, Trimethoprim, Carbamazepin, Terbutalin, Bezafibrat, Clofibrinsäure (mit pH-Einstellung), Fenofibrat und Theophyllin konnte keine LC₅₀ berechnet werden, da diese Stoffe nur bis zur Löslichkeitsgrenze untersucht werden konnten.

Bei den drei Stoffen, Oxytetrazyklin, Acetylcystein (ACC) und Clofibrinsäure, trat eine pH-abhängige Wirkung auf. Bei Oxytetrazyklin zeigten sich geringe Unterschiede zwischen dem Versuch ohne und dem Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (Faktor: 3). Größere Unterschiede traten bei ACC und Clofibrinsäure auf.

Es zeigten sich für einen großen Teil der Substanzen zudem steile Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen, wie in Tabelle 3-134 am Beispiel von Acetylsalicylsäure dargestellt.

Tabelle 3-134: Darstellung der ermittelten letalen Konzentrationen nach 48 Stunden für Acetylsalicylsäure, wobei nur die koagulierten Embryonen in die Berechnung eingeflossen sind (CL: Vertrauensintervall).

	LC ₅	LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₇₀	LC ₉₉
[µmol/L]	279,8	293,1	310,2	345,5	369,4	465,7
upper 95%CL	279,2	292,6	309,7	344,9	368,6	4463,6
lower 95% CL	280,4	293,6	310,7	346,0	370,2	467,8
upper 99% CL	278,7	292,2	309,4	344,4	367,9	461,8
lower 99% CL	280,9	293,5	311,1	346,6	370,9	469,7

3.2.1.2 Subletale Effekte

In Tabelle 3-135 sind die, bei den einzelnen Substanzen beobachteten, subletalen Effekte zusammengestellt. Wie aus der Tabelle und Abbildung 3-63 hervorgeht, können keiner Substanzklasse spezifische subletale Effekt zugeordnet werden.

Tabelle 3-135: Darstellung der beobachteten subletalen Effekte (hB: hohe Blastula deformiert; G: keine Gastrulation; Sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So: deformierte Somiten; Adef: deformierte Augenanlage; Kdef: Kopf deformiert; Swdef; deformierter Schwanz; Wsdef: deformierte Wirbelsäule; H: kein Herzschlag; Bk: kein Blutkreislauf; Oe: Ödeme; P: Pigmentierung; Oto: Otolithen deformiert oder fehlend; +: Effekt beobachtet).

	hB	G	Sw	So	Adef	Kdef	Swdef	Wsdef	H	Bk	Oe	P	Oto
Analgetika													
ASS	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+
Diclofenac		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ibuprofen		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naproxen		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Paracetamol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibiotika													
Chloramphenicol			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clarithromycin					+		+			+	+	+	
Erythromycin							+	+		+	+	+	
Oxytetracyclin				+	+		+	+		+	+	+	
Roxithromycin			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sulfamethoxazol						+	+	+		+	+	+	
Trimethoprim							+	+	+	+	+	+	+
Antidote													
ACC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Atropin		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antiepileptika													
Carbamazepin				+			+	+	+	+	+	+	+
Valproinsäure		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Blocker													
Bisoprolol				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metoprolol		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propranolol		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fortsetzung Tabelle 3-135

	hB	G	Sw	So	Adef	Kdef	Swdef	Wsdef	H	Bk	Oe	P	Oto
β-Sympathomimetika													
Clenbuterol		+	+		+	+	+		+	+	+	+	+
Salbutamol								+		+	+	+	
Terbutalin		+			+		+		+	+	+	+	
gemischte Stoffgruppe													
EE ₂	+	+			+	+			+	+	+	+	
Tamoxifen		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Verapamil			+		+	+	+		+	+	+	+	+
Lipid-Senker													
Bezafibrat										+	+	+	+
Clofibrinsäure			+		+	+	+	+		+	+	+	+
Fenofibrat		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Pestizide													
Carbaryl		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
Malathion		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Parathion		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spasmolytika													
Coffein		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Theophyllin		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Zytostatika													
Cyclophosphamid								+		+	+	+	+
Ifosfamid			+		+		+	+	+	+	+	+	+

In Abbildung 3-63 sind die prozentualen Häufigkeiten der beobachteten subletalen Effekte zusammenfassend dargestellt. Mit Ausnahme der Effekte auf die hohe Blastula, waren alle subletalen Effekte bei über 50% der untersuchten Substanzen zu beobachten. Eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems und Ödeme zeigten sich bei allen Substanzen.

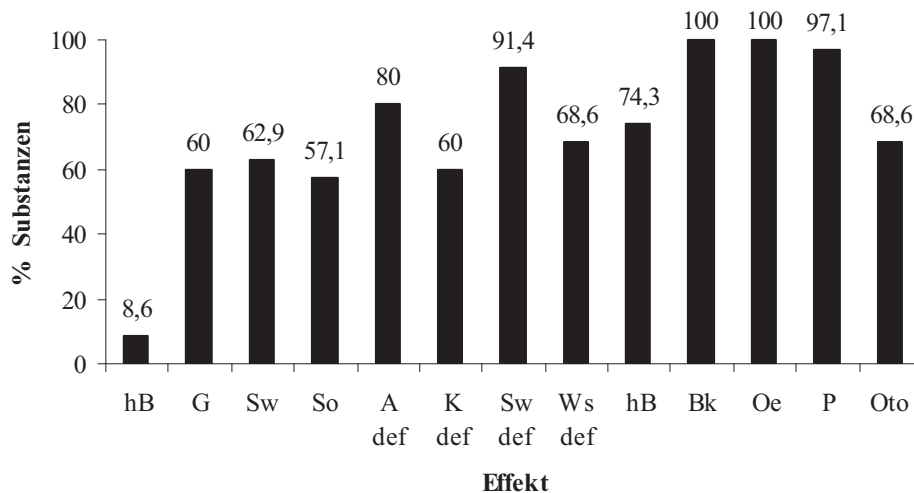


Abbildung 3-63: Prozentuale Häufigkeit der beobachteten Effekten (hB: hohe Blastula deformiert; G: keine Gastrulation; Sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So: deformierte Somiten; Adef: deformierte Augenanlage; Kdef: Kopf deformiert; Swdef; deformierter Schwanz; Wsdef: deformierte Wirbelsäule; H: kein Herzschlag; Bk: kein Blutkreislauf; Oe: Ödeme; P: Pigmentierung; Oto: Otolithen deformiert oder fehlend).

Auf Basis der Einzelstoffdaten wurde eine Auswahl für die zu untersuchenden Mischungen getroffen. Es wurden alle Stoffe mit einer $LC_{50}(48h)$ bzw. NOEC von unter 1000 mg/L ausgewählt. Es wurden die Stoffgruppe der Analgetika bestehend aus Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol, die Pestizide Carbaryl, Malathion und Parathion sowie die gemischte Stoffgruppe mit unähnlichen Wirkmechanismen (17- α -Ethinylöstradiol, Tamoxifen und Verapamil) ausgesucht und als Mischungen untersucht. Zusätzlich wurden für die Untersuchung komplexerer Gemische aus Substanzen gleicher wie auch verschiedener Wirkmechanismen Coffein, Propranolol und Valproinsäure ausgewählt. Für die Untersuchung verschiedener NOEC-Mischungen wurden zudem Bezafibrat, Carbamazepin, Clarithromycin, Clenbuterol, Clofibrinsäure, Cyclophosphamid, Erythromycin, Fenofibrat, Roxithromycin, Sulfamethoxazol und Theophyllin ausgesucht.

4 Ergebnisse & Diskussion Kombinationsexperimente

Es werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen der Mischungen der einzelnen Substanzklassen Analgetika, Pflanzenschutzmittel (PSM) und der gemischten Stoffgruppe mit unähnlichen Wirkmechanismen vorgestellt. Anschließend werden die Ergebnisse der multiplen Gemische auf Basis der $LC_{20}(48h)$ und $LC_{10}(48h)$ bzw. der NOEC dargestellt.

Als gemeinsamer Endpunkt für die genannten Untersuchungen wurden die letalen Effekte gewählt.

Es wurden zudem drei binäre Mischungen basierend auf der $EC_{50}(48h)$ eines bestimmten subletalen Endpunktes untersucht. Als Endpunkte wurden jeweils „kein Blutkreislauf“, „Pigmentierung“ sowie „Deformationen“ gewählt und die Substanzen ASS und Naproxen, Propranolol und Tamoxifen sowie Diclofenac und Valproinsäure als Mischungen untersucht. Da jedoch in den durchgeführten Experimenten, entgegen der Erwartung, nur wenige subletale Effekte zu beobachten und eine Auswertung der Versuche daher nicht sinnvoll war, wird auf die Darstellung der Ergebnisse hier verzichtet. Die Eignung subletaler Effekte für die Untersuchung der Kombinationswirkung von Chemikalien ist jedoch ein wichtiger Aspekt sollte weitergehend untersucht werden.

4.1 Mischungen der einzelnen Substanzklassen

4.1.1 Analgetika

Es wurden Mischungen der fünf Substanzen Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol getestet. Es wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um ein geeignetes Modell bzw. Design für die Untersuchung der Kombinationswirkung der Pharmaka und Pestizide zu finden und die Frage zu klären, ob die Fokussierung auf vier letale Endpunkte im Embryotest (2.3) einen Einfluss auf das Ergebnis von Kombinationsexperimenten hat. Dazu wurden jeweils zwei verschiedene Ansätze mit zwei unterschiedlichen Modellen untersucht. In einem ersten Ansatz wurden die LC_x -Werte basierend auf allen vier letalen Endpunkte verwendet und sowohl mit dem Ansatz nach Cleuvers (2003) als auch mit dem *modified toxic unit approach* nach Pape-Lindstrom und Lydy (1997) untersucht (2.4). In einem zweiten Ansatz wurden die entsprechenden Untersuchungen basierend auf den LC_x -Werten durchgeführt, die ausschließlich anhand der koagulierten Embryonen ermittelt wurden.

Für die durchgeführten Versuche wurden, aufgrund der Literaturdaten, ähnliche Wirkmechanismen für die Analgetika angenommen und eine additive Mischungstoxizität erwartet.

Bei der nachfolgenden Darstellung der Ergebnisse der Vorversuche wurde auf eine eingehende Betrachtung der subletalen Effekte verzichtet, da in den Hauptversuchen ähnliche Effekte zu beobachten waren.

4.1.1.1 Vorversuche

4.1.1.1.1 Basierend auf allen vier als letal definierten Endpunkten – beobachtete Effekte

Testansatz nach Cleuvers (2003)

Für die beiden durchgeführten Versuche wurden die LC_x-Werte zugrunde gelegt, die unter Berücksichtigung aller vier letaler Endpunkte berechnet wurden. Als Testkonzentrationen wurden jeweils 1/5 der, in den Einzelsubstanzversuchen nach 48 Stunden berechneten LC₅-, LC₁₀-, LC₂₀-, LC₅₀- und LC₇₀-Werte eingesetzt. Nach Gleichung 2 (2.4) sollten, bei additiver Mischungstoxizität, 5, 10, 20, 50 bzw. 70% der eingesetzten Embryonen in den einzelnen Konzentrationen letale Effekte zeigen. Die untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 4-1 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-1: Testkonzentrationen der beiden untersuchten Mischungen der Analgetika (Test 1 & 2) nach Cleuvers (2003). Die zugrundeliegenden LC_x-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet.

	Konzentration				
	LC ₅ /5	LC ₁₀ /5	LC ₂₀ /5	LC ₅₀ /5	LC ₇₀ /5
Acetylsalicylsäure	43,2	44,5	45,9	48,7	50,6
Diclofenac	1,2	1,3	1,5	1,9	2,2
Ibuprofen	7,8	10,4	14,1	22,2	27,7
Naproxen	24,7	29,0	35,2	50,9	64,0
Paracetamol	792,7	948,0	1151,1	1604,3	1965,2
Gesamtkonzentration [$\mu\text{mol/L}$]	869,6	1033,2	1247,8	1728,0	2109,2

Test 1

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert wurden sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende bestimmt. Die Werte des Kontrollmediums und der einzelnen Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind in Anhang C (Tabelle 48) zusammengestellt.

Der Test ist valide da innerhalb der 48-stündigen Versuchsdauer an den Kontrollembryonen keine letalen Effekte zu beobachten waren.

In Tabelle 4-2 sind die während der 48-stündigen Expositionsdauer beobachteten letalen Effekte zusammenfassend dargestellt. Erst ab 1728,1 $\mu\text{mol/L}$ zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 1939,4 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 9,600; b: 10,7; LC₁₀: 1473,0 $\mu\text{mol/L}$) ermittelt.

Tabelle 4-2: Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 1 der Mischung der Analgetika nach Cleuvers (2003), wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC_x-Werte der Einzelstoffe alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	869,6	1033,2	1247,8	1728,0	2109,2
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	1/20	-	-	-
	48	-	-	1/20	-	-	-
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	6/20	13/20
gesamt [%]	48	-	-	5	-	30	65
Vorhersage CA [%]	-	-	5	10	20	50	70

Test 2

Auch für Test 2 wurden Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert vor Testbeginn und nach Testende bestimmt. Die Werte des Kontrollmediums und der einzelnen Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind in Anhang C (Tabelle 49) zusammengestellt.

Der Test ist valide da innerhalb der 48-stündigen Versuchsdauer bei maximal 5% der Kontrollembryonen letale Effekte zu beobachten waren.

In Tabelle 4-3 sind die während der 48-stündigen Expositionsdauer beobachteten letalen Effekte zusammenfassend dargestellt. Auch in diesem Versuch zeigte sich erst ab 1728,1 $\mu\text{mol/L}$ eine konzentrationsabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 2398,20 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 1,000; b: 11,392; LC₁₀: 1851 $\mu\text{mol/L}$) ermittelt.

Tabelle 4-3: Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 2 der Mischung der Analgetika nach Cleuvers (2003), wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC_x-Werte der Einzelstoffe alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]					
		K	869,6	1033,2	1247,8	1728,0	2109,2
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-
	24	1/20	-	-	-	-	1/20
	36	1/20	-	-	-	-	1/20
	48	1/20	-	-	-	-	1/20
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	2/20	5/20
gesamt [%]	48	5	-	-	-	10	30
Vorhersage CA [%]	-	-	5	10	20	50	70

Testansatz nach dem *modified toxic unit approach*

Für den durchgeführten Versuch wurde die LC₅₀(48h) basierend auf allen vier letalen Endpunkten zugrunde gelegt. Die in diesem Ansatz untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 4-4 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-4: Testkonzentrationen für Test 1 der untersuchten Mischung der Analgetika nach dem *modified toxic unit approach*. Die zugrundeliegenden LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkten berechnet (Test 1; TU: Toxic Units).

	TU				
	0,25	0,5	1	2	4
Acetylsalicylsäure	12,2	24,4	48,7	97,4	194,9
Diclofenac	0,5	0,97	1,9	3,9	7,8
Ibuprofen	5,6	11,1	22,2	44,4	88,8
Naproxen	12,7	25,5	50,9	101,8	203,6
Paracetamol	401,1	802,2	1604,3	3208,6	6417,3
Gesamtkonzentration [$\mu\text{mol/L}$]	432,1	864,2	1728,0	3456,1	6912,4

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert wurden vor Testbeginn und nach Testende bestimmt. Die Werte des Kontrollmediums und der einzelnen Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind in Anhang C (Tabelle 51) zusammengestellt.

Der Test ist valide da innerhalb der 48-stündigen Versuchsdauer an den Kontrollembryonen keine letalen Effekte zu beobachten waren.

In Tabelle 4-5 sind die während der 48-stündigen Expositionsdauer beobachteten letalen Effekte zusammenfassend dargestellt. Ab der Gesamtkonzentration von 1 TU zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 1,25 TU (1,16- 1,35 TU) ermittelt.

Tabelle 4-5: Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 1 der Mischung der Analgetika nach dem *modified toxic unit approach*, wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; TU: Toxic Units; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	TU					
		K	0,25	0,5	1	2	4
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	5/20
	12	-	-	-	-	4/20	20/20
	24	-	1/19	-	-	20/20	20/20
	36	-	1/19	-	-	20/20	20/20
	48	-	1/19	-	1/20	20/20	20/20
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	koa	koa
	36	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	koa	koa
keine Schwanzablösung	24	-	1/19	-	-	koa	koa
	36	-	1/19	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	1/19	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	3/20	koa	koa
gesamt [%]	48	-	5,3	-	20	100	100

4.1.1.1.2 Basierend auf den koagulierten Embryonen – beobachtete Effekte

Testansatz nach Cleuvers (2003)

Für den durchgeführten Versuch wurden die LC_x-Werte basierend auf den koagulierten Embryonen zugrunde gelegt. Als Testkonzentrationen wurden jeweils 1/5 der, in den Einzelsubstanzversuchen erhaltenen LC₁₀-, LC₂₀-, LC₅₀-, LC₇₀- sowie LC₉₉- Werte eingesetzt. Bei additiver Mischungstoxizität sollten nach Gleichung 2 (2.4) 10, 20, 50, 70 bzw. 99% der

Embryonen in den einzelnen Konzentrationen letale Effekte zeigen. Die untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 4-6 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-6: Testkonzentrationen für Test 3 der untersuchten Mischung der Analgetika nach Cleuvers (2003). Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC_x-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt.

	Konzentration				
	LC _{10/5}	LC _{20/5}	LC _{50/5}	LC _{70/5}	LC _{99/5}
Acetylsalicylsäure	58,6	62,0	69,1	73,9	93,1
Diclofenac	25,0	29,7	38,5	43,8	59,6
Ibuprofen	25,4	29,7	40,1	48,3	91,9
Naproxen	36,0	39,5	47,4	52,8	78,4
Paracetamol	1203,1	1529,4	2414,3	3206,7	8567,2
Gesamtkonzentration [$\mu\text{mol/L}$]	1348,1	1690,3	2609,4	3425,5	8889,9

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert wurden vor Testbeginn und nach Testende bestimmt. Die Werte des Kontrollmediums und der einzelnen Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind in Anhang C (Tabelle 50) zusammengestellt.

Der Test ist valide da innerhalb der 48-stündigen Versuchsdauer an den Kontrollembryonen keine letalen Effekte zu beobachten waren.

In Tabelle 4-7 sind die während der 48-stündigen Expositionsdauer beobachteten letalen Effekte zusammenfassend dargestellt. Breits ab 1348 $\mu\text{mol/L}$ zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der koagulierten Embryonen. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 2142,5 $\mu\text{mol/L}$ (r^2 : 0,8470; b: 5,688; LC₁₀: 1276,4 $\mu\text{mol/L}$) ermittelt.

Tabelle 4-7: Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 3 der Mischung der Analgetika nach Cleuvers (2003), wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC_x-Werte der Einzelstoffe ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	K	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]				
			1348,1	1690,3	2609,4	3425,5	8889,9
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	1/20	-	-	-	20/20
	12	-	1/20	-	2/20	5/20	20/20
	24	-	3/20	2/20	11/20	19/20	20/20
	36	-	4/20	2/20	11/20	20/20	20/20
	48	-	5/20	4/20	12/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	25	20	60	100	100
Vorhersage CA [%]	-	-	10	20	50	70	99

Testansatz nach dem *modified toxic unit approach*

Für den durchgeführten Versuch wurde der LC₅₀-Wert basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen eingesetzt. Die untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 4-8 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-8: Testkonzentrationen für Test 2 der untersuchten Mischung der Analgetika nach dem *modified toxic unit approach*. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt

	TU				
	0,25	0,5	1	2	4
Acetylsalicylsäure	17,3	34,6	69,1	138,2	276,4
Diclofenac	9,6	19,3	38,5	77,0	154,1
Ibuprofen	10,0	20,1	40,1	80,2	160,4
Naproxen	11,9	23,7	47,4	94,8	189,7
Paracetamol	603,6	1207,2	2414,3	4828,6	9657,3
Gesamtkonzentration [µmol/L]	652,4	1304,9	2609,4	5218,8	10437,9

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert wurden vor Testbeginn und nach Testende bestimmt. Die Werte des Kontrollmediums und der einzelnen Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind in Anhang C (Tabelle 52) zusammengestellt.

Der Test ist valide da innerhalb der 48-stündigen Versuchsdauer an den Kontrollembryonen keine letalen Effekte zu beobachten waren.

In Tabelle 4-9 sind die während der 48-stündigen Expositionsdauer beobachteten letalen Effekte zusammenfassend dargestellt. Ab einer Gesamtkonzentration von 0,5 TU zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der letalen Effekte. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 0,77 TU (0,66- 0,89 TU) ermittelt.

Tabelle 4-9: Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 2 der Mischung der Analgetika nach dem *modified toxic unit approach*, wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; TU: Toxic Units; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	K	TU				
			0,25	0,5	1	2	4
Koagulation	4	-	-	-	-	-	16/19
	8	-	-	-	-	20/20	19/19
	12	-	-	-	-	20/20	19/19
	24	-	-	-	9/20	20/20	19/19
	36	-	-	-	9/20	20/20	19/19
	48	-	-	5/20	13/20	20/20	19/19
gesamt [%]	48	-	-	25	65	100	100

Da Paracetamol im Einzelsubstanzversuch deutlich weniger toxisch war als die übrigen vier Substanzen, stellte sich die Frage nach seinem Einfluss auf die Mischungstoxizität. Es wurden daher zwei weitere Versuche, wiederum auf Basis der LC_{50} , die nur mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde, jedoch ohne Paracetamol, durchgeführt. Um zunächst nur einen Parameter zu verändern wurden die gleichen Konzentrationen wie in Test 2 untersucht. In einem nächsten Schritt wurden dann die Konzentrationen nach den Vorgaben des Modells (2.4) angeglichen.

4.1.1.1.3 Basierend auf den koagulierten Embryonen ; ohne Paracetamol – beobachtete Effekte

Test 1

Auch für diesen Versuch wurde der LC_{50} -Wert basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen eingesetzt. Die untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 4-10 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-10: Testkonzentrationen für Test 3 der untersuchten Mischung der Analgetika ohne Paracetamol nach dem *modified toxic unit approach*. Für die Berechnung der zugrundeliegenden $LC_{50}(48h)$ -Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt

Substanz	TU				
	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2
Acetylsalicylsäure	17,3	34,6	69,1	138,2	276,4
Diclofenac	9,6	19,3	38,5	77,0	154,1
Ibuprofen	10,0	20,1	40,1	80,2	160,4
Naproxen	11,9	23,7	47,4	94,8	189,7
Gesamtkonzentration [$\mu\text{mol/L}$]	48,8	97,7	195,1	390,2	780,6

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert wurden vor Testbeginn und nach Testende bestimmt. Die Werte des Kontrollmediums und der einzelnen Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind in Anhang C (Tabelle 53) zusammengestellt.

Der Test ist valide da innerhalb der 48-stündigen Versuchsdauer an den Kontrollembryonen keine letalen Effekte zu beobachten waren.

In Tabelle 4-11 sind die während der 48-stündigen Expositionsdauer beobachteten letalen Effekte zusammenfassend dargestellt. Ab einer Gesamtkonzentration von 0,4 TU zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der koagulierten Embryonen. Es wurde eine $LC_{50}(48h)$ von 0,6 TU (0,60- 0,61 TU) ermittelt.

Tabelle 4-11: Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 3 der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol nach dem *modified toxic unit approach*, wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; TU: Toxic Units; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	TU					
		K	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	13/20	20/20
	12	-	-	-	14/21	19/20	20/20
	24	-	-	-	14/21	20/20	20/20
	36	-	-	-	15/21	20/20	20/20
	48	-	-	3/20	16/21	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	-	15	76,2	100	100

Test 2

Für den durchgeführten Versuch wurde der LC₅₀-Wert basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen eingesetzt. Die untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 4-12 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-12: Testkonzentrationen für Test 4 der untersuchten Mischung der Analgetika ohne Paracetamol mit den angepassten Konzentrationen nach dem *modified toxic unit approach*. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt.

Substanz	Toxic Units				
	0,25	0,5	1	2	4
Acetylsalicylsäure	21,6	43,2	86,4	172,8	345,5
Diclofenac	12,0	24,1	48,2	96,3	192,6
Ibuprofen	12,5	25,1	50,1	100,3	200,5
Naproxen	14,8	29,6	59,3	118,6	237,1
Gesamtkonzentration [μ mol/L]	60,9	122,0	244,0	488,0	975,7

Sauerstoffsättigung, Leitfähigkeit und pH-Wert wurden vor Testbeginn und nach Testende bestimmt. Die Werte des Kontrollmediums und der einzelnen Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die gemessenen Werte sind in Anhang C (Tabelle 54) zusammengestellt.

Der Test ist valide da innerhalb der 48-stündigen Versuchsdauer an den Kontrollembryonen keine letalen Effekte zu beobachten waren.

In Tabelle 4-13 sind die während der 48-stündigen Expositionsdauer beobachteten letalen Effekte zusammenfassend dargestellt. Bereits ab einer Gesamtkonzentration von 0,25 TU zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der koagulierten Embryonen. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 0,64 TU (0,55- 0,75 TU) ermittelt.

Tabelle 4-13: Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 4 der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol mit den angepassten Konzentrationen nach dem *modified toxic unit approach*, wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; TU: Toxic Units; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	TU					
		K	0,25	0,5	1	2	4
Koagulation	4	-	-	-	-	20/20	20/20
	8	-	-	-	-	20/20	20/20
	12	-	-	-	1/20	20/20	20/20
	24	-	1/20	-	13/20	20/20	20/20
	36	-	1/20	-	14/20	20/20	20/20
	48	-	2/20	6/20	16/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	10	30	80	100	100

4.1.1.1.4 Vorversuche - zusammenfassende Betrachtung

Es wurden in den Vorversuchen zwei unterschiedliche Ansätze mit zwei unterschiedlichen Modellen untersucht. Im ersten Ansatz wurden alle vier, nach Schulte & Nagel (1994) als letal definierten Endpunkte in die Auswertung einbezogen und sowohl nach Cleuvers (2003) als auch mit dem *modified toxic unit approach* nach Pape-Lindstrom und Lydy (1997) untersucht. Im zweiten Ansatz wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet und Mischungen entsprechend dieser Vorgaben mit den beiden genannten Modellen getestet.

Testansatz nach Cleuvers (2003)

In Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2 sind die beobachtete Mortalität und die Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* zusammengestellt. Es wurde diese Art der Darstellung gewählt, da es sich bei den einzelnen Konzentrationen jeweils um eine Punktschätzung für das jeweilige Effektniveau handelt und die Darstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung daher nicht sinnvoll ist.

Es zeigten sich in den beiden Versuchen, in denen die LC_x-Werte basierend auf allen vier letalen Endpunkten verwendet wurden, in allen untersuchten Konzentrationen weniger letale Effekte als nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagt wurde (Abbildung 4-1). Im Versuch, in dem die LC_x-Werte basierend auf den koagulierten Embryonen verwendet wurden, zeigten sich allerdings in allen untersuchten Konzentrationen mehr Effekt als nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagt wurde (Abbildung 4-2).

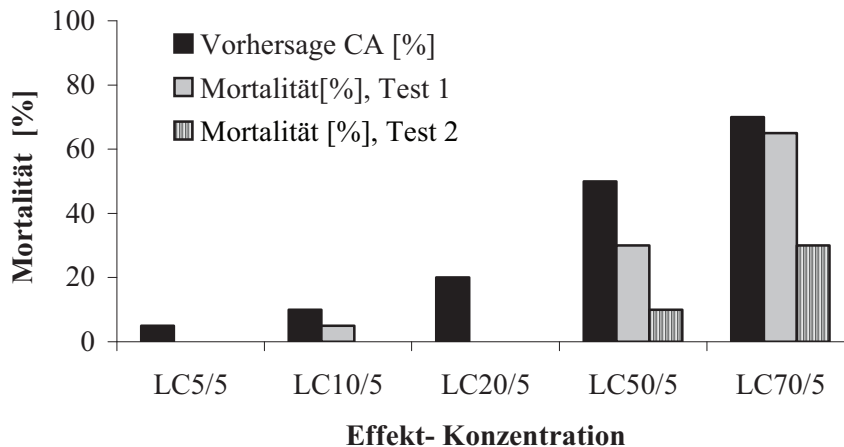


Abbildung 4-1: Vergleich der beobachteten Mortalität in beiden durchgeführten Versuchen nach Cleuvers (2003) basierend auf allen vier letalen Endpunkten (Test 1 & Test 2) mit der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA).

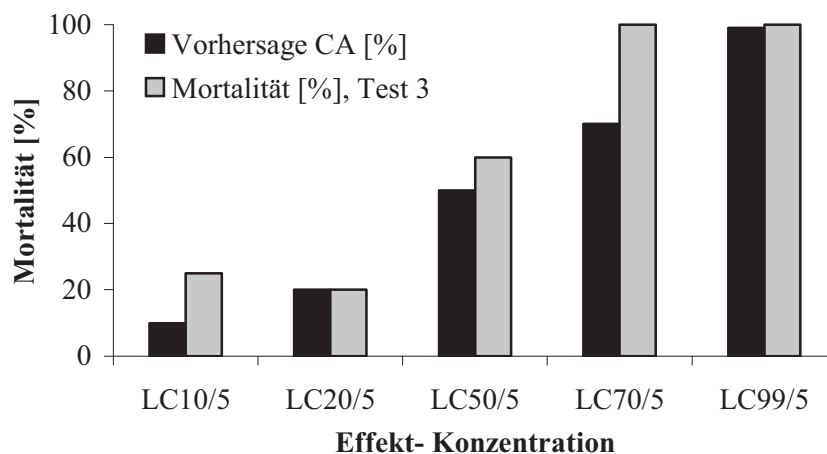


Abbildung 4-2: Vergleich der beobachteten Mortalität im durchgeführten Versuch nach Cleuvers (2003) basierend auf den koagulierten Embryonen (Test 3) mit der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA).

Testansatz nach dem *modified toxic unit approach*

In Tabelle 4-14 sind die ermittelten $LC_{50}(48h)$ -Werte aller vier untersuchten Mischungen zusammenfassend dargestellt. Die berechneten LC_{50} -Werte lassen sich nach Pape-Lindstrom & Lydy (1997) wie folgt klassifizieren:

$LC_{50} > 1$: weniger als additiv (IA)

$LC_{50} = 1$: additiv (CA)

$LC_{50} < 1$: mehr als additiv.

Abweichungen von CA und damit von einer $LC_{50}(48h)$ von 1TU sind dann als signifikant anzusehen, wenn das 95% Vertrauensintervall außerhalb des Wertes von 1TU liegt (Pape-Lindstrom & Lydy, 1997; Overmyer et al., 2003).

Tabelle 4-14: Darstellung der berechneten mittleren letalen Konzentrationen ($LC_{50}(48h)$, mit 95% Vertrauensintervall) für die vier untersuchten Mischungen nach dem *modified toxic unit approach* (aEP: Test basierend auf der $LC_{50}(48h)$ der Einzelstoffe, die unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet wurden; koa: Test basierend auf der $LC_{50}(48h)$ der Einzelstoffe, die nur unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen berechnet wurden; koa oP: Test ohne Paracetamol basierend auf der $LC_{50}(48h)$ der Einzelstoffe, die nur unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen berechnet wurden).

	Test 1 aEP	Test 2 koa	Test 3 koa, oP	Test 4 koa, oP
$LC_{50}(48h)$, TU	1,25 (1,16 - 1,35)	0,77 (0,66 – 0,89)	0,60 (0,60 – 0,61)	0,64 (0,55 – 0,75)

Wie Tabelle 4-14 zu entnehmen ist, ergeben sich auch hier je nach Wahl des Endpunktes unterschiedliche Aussagen zur Mischungstoxizität der Analgetika. Verwendet man für die Versuche die $LC_{50}(48h)$ der Einzelstoffe, die unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet wurden, als Basis für die Mischung, so ist die Mischungstoxizität mit einer $LC_{50}(48h)$ von 1,25 TU und einem 95% Vertrauensintervall von 1,16-1,35 TU weniger als additiv. Verwendet man dagegen für die Versuche die $LC_{50}(48h)$ der Einzelstoffe, die nur unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen berechnet wurden, als Basis für die Mischung, so ist die Mischungstoxizität mit einer $LC_{50}(48h)$ von 0,77 TU und einem 95% Vertrauensintervall von 0,66 – 0,89 TU mehr als additiv. Noch deutlicher zeigt sich dieser Effekt wenn die Versuche ohne Paracetamol durchgeführt werden, was für einen dämpfenden Einfluss der Substanz spricht.

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigen, dass die Einbeziehung verschiedener letaler Endpunkte bei der Auswertung der Kombinationswirkung von Chemikalien im *DarT* zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. In den Untersuchungen mit beiden Modellen basierend auf allen vier letalen Endpunkten war die Mischungstoxizität weniger als additiv, in den Untersuchungen basierend auf den koagulierten Embryonen dagegen mehr als additiv. Es stellte sich daher die Frage, ob das Testdesign die Ergebnisse beeinflusst hat, da drei der letalen Endpunkte, fehlende Schwanzablösung vom Dotter, fehlende Somiten sowie fehlender Herzschlag auch Indikatoren für einen spezifischen Wirkmechanismus sein können. Um die erhaltenen Ergebnisse der Vorversuche zu bestätigen, wurden die drei verschiedene Ansätze noch einmal in den Hauptversuchen untersucht: basierend auf allen vier letalen Endpunkten, basierend auf den koagulierten Embryonen, basierend auf den koagulierten Embryonen jedoch ohne Paracetamol. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde am fixed ratio design festgehalten. Die Vorhersagen nach den beiden Konzepten, „Konzentrationsadditivität“ und „Unabhängige Wirkung“, wurden mittels der Gleichungen 3 und 6 (2.4) vorgenommen.

4.1.1.2 Hauptversuche

4.1.1.2.1 Basierend auf allen vier als letal definierten Endpunkten – beobachtete Effekte

Für den durchgeführten Versuch wurde die LC₂₀(48h) basierend auf allen vier letalen Endpunkten zugrundegelegt. Die untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 4-15 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-15: Testkonzentrationen der untersuchten Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet.

	Konzentration							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ASS	1,8	3,6	7,2	14,3	28,7	57,4	114,7	229,4
Diclofenac	0,06	0,1	0,2	0,5	1,0	1,9	3,8	7,6
Ibuprofen	0,6	1,1	2,2	4,4	8,8	17,6	35,2	70,5
Naproxen	1,4	2,8	5,5	11,0	22,0	44,0	88,1	176,1
Paracetamol	45,0	89,9	179,8	359,7	719,5	1438,9	2877,8	5755,6
Gesamtkonzentration [µmol/L]	48,9	97,5	194,9	389,9	780,0	1559,8	3119,6	6239,2

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende bestimmt. Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen für in dem für den Test zulässigen Bereich. In Konzentration 8 (6239,2 µmol/l) lag der pH-Wert unter 5, so dass eine Beeinträchtigung der Embryonen durch den niedrigen pH-Wert nicht ausgeschlossen werden kann. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 55 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine letalen und nur bei maximal 10% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der letalen Effekte ist in Tabelle 4-16 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab Konzentration 5 (780 µmol/L) konzentrations- und zeitabhängig zu. Auf Basis aller vier als letal definierten Endpunkte (2.3) wurde eine LC₅₀(48h) von 1349,8 µmol/L (r^2 : 0,9730; b: 5,446; LC₁₀: 785,6 µmol/L) berechnet.

Tabelle 4-16: Zusammenstellung der letalen Effekte Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet (1: 48,9 µmol/L; 2: 97,5 µmol/L; 3: 194,9 µmol/L-; 4: 389,9 µmol/L; 5: 780 µmol/L; 6: 1559,8 µmol/L; 7: 3119,6 µmol/LP; 8: 6239,2 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zu angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration								
		K	1	2	3	4	5	6	7	8
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-	-	-	19/20
	8	-	-	-	-	-	-	-	20/20	20/20
	12	-	-	-	-	-	-	-	20/20	20/20
	24	-	1/20	-	-	-	-	1/20	20/20	20/20
	36	-	1/20	-	-	-	-	2/20	20/20	20/20
	48	-	1/20	-	-	-	-	3/20	20/20	20/20
keine Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	-	1/20	koa	koa
	36	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa
keine Schwanzablösung	24	-	-	1/19	-	-	1/20	5/20	koa	koa
	36	-	-	1/19	-	-	-	4/20	koa	koa
	48	-	-	1/19	-	-	-	4/20	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	-	1/19	-	-	2/20	18/20	koa	koa
	48	-	-	1/19	-	-	1/20	10/20	koa	koa
gesamt [%]	48	-	5	5,3	-	-	5	65	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 4-17 zusammenfassend dargestellt. Es zeigte sich nach 8 Stunden bei einzelnen Embryonen eine Verzögerung beim Beginn der Gastrulation. Deformationen waren an Somiten, Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule zu beobachten. Auch traten eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Blutkreislaufsystems und der Pigmentierung sowie Ödeme auf. Außerdem waren bei einzelnen Embryonen keine Otolithen in den Sacculi angelegt.

Tabelle 4-17: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet (1: 48,9 µmol/L; 2: 97,5 µmol/L; 3: 194,9 µmol/L-; 4: 389,9 µmol/L; 5: 780 µmol/L; 6: 1559,8 µmol/L; 7: 3119,6 µmol/LP; 8: 6239,2 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration								
		K	1	2	3	4	5	6	7	8
keine Gastrulation	8	-	-	1/20	3/20	1/20	4/20	1/20	-	koa
	12	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa
deformierte Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa
	36	-	-	-	-	-	-	1/18	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa
keine oder deformierte Augenanlage	24	-	-	1/20	3/20	2/20	4/20	5/19	koa	koa
	36	-	-	1/20	-	-	-	4/18	koa	koa
	48	-	-	1/20	-	-	-	1/17	koa	koa
deformierter Kopf	24	-	-	1/20	-	-	-	5/19	koa	koa
	36	-	-	1/20	-	-	-	4/18	koa	koa
	48	-	-	1/20	-	-	-	1/17	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	1/20	3/20	2/20	4/20	5/19	koa	koa
	36	-	-	1/20	-	-	2/20	4/18	koa	koa
	48	-	-	1/20	-	-	2/20	16/17	koa	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	1/20	-	-	1/20	5/19	koa	koa
	36	-	-	1/20	-	-	2/20	4/18	koa	koa
	48	-	-	1/20	-	-	2/20	16/17	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	-	1/19	1/20	-	5/20	11/20	18/18	koa	koa
	48	-	1/19	1/20	-	1/20	9/20	17/17	koa	koa
keine Pigmentierung	48	3/32	-	1/20	-	1/20	-	3/17	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	1/20	-	-	7/20	14/17	koa	koa
Dotterödem	48	-	1/19	-	-	4/20	11/20	16/17	koa	koa
Perikardödem	48	-	1/19	-	-	5/20	11/20	16/17	koa	koa
gesamt	48	-	1/19	-	-	5/20	11/20	16/17	koa	koa
keine oder deformierte Otolithen	48	-	-	1/20	-	-	1/20	3/17	koa	koa

Wie Abbildung 4-3 zu entnehmen ist, zeigte sich ab Konzentration 4 (389,9 µmol/L) eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunnetts Test wurden eine NOEC von 194,9 µmol/L sowie eine LOEC von 389,9 µmol/L ermittelt.

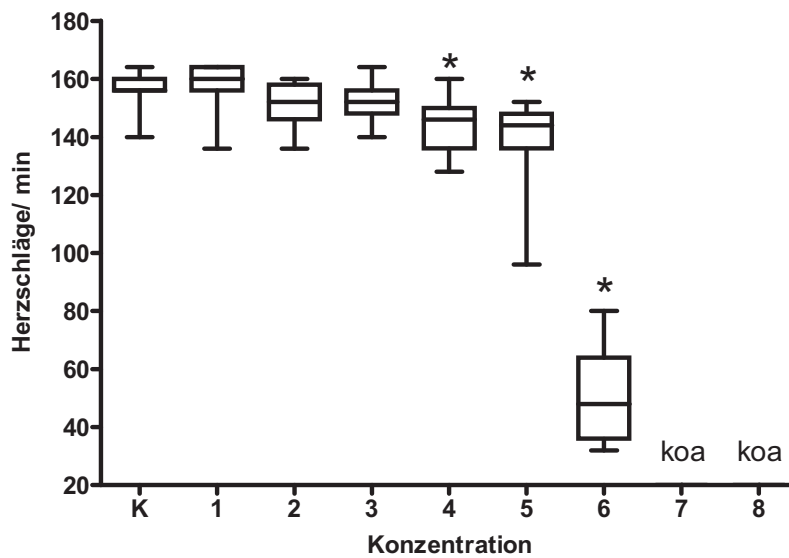


Abbildung 4-3: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden $LC_{20}(48h)$ -Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; 1: $48,9 \mu\text{mol/L}$; 2: $97,5 \mu\text{mol/L}$; 3: $194,9 \mu\text{mol/L}$; 4: $389,9 \mu\text{mol/L}$; 5: $780 \mu\text{mol/L}$; 6: $1559,8 \mu\text{mol/L}$; 7: $3119,6 \mu\text{mol/LP}$; 8: $6239,2 \mu\text{mol/L}$; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 4-18 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-18: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden $LC_{20}(48h)$ -Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).

	Zeit[h]	[$\mu\text{mol/L}$]
LC_{50} aEP	48	1349,8
EC_{50} kein Herzschlag	48	1553,5
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	800,8
EC_{50} Ödeme	48	668,8
EC_{50} Pigmentierung	48	1042,2
EC_{50} Schwanzdeformation	48	1079,1
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	1079,1
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	194,9
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	388,9

4.1.1.2.2 Basierend auf den koagulierten Embryonen – beobachtete Effekte

Für diesen Ansatz wurden die in Tabelle 4-19 zusammengefassten Konzentrationen der Mischung untersucht.

Tabelle 4-19: Testkonzentrationen untersuchten Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt.

Substanz	Konzentration								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ASS	1,2	2,4	4,8	9,7	19,4	38,8	77,6	155,1	310,2
Diclofenac	0,6	1,2	2,3	4,6	9,3	18,5	37,1	74,2	148,3
Ibuprofen	0,6	1,2	2,3	4,6	9,3	18,6	37,2	74,4	148,7
Naproxen	0,8	1,5	3,1	6,2	12,4	24,7	49,4	98,9	197,7
Paracetamol	29,9	59,7	119,5	239,0	477,9	955,9	1911,7	3823,4	7646,8
Gesamtkonzentration [µmol/L]	33,1	66,0	132,0	264,1	528,3	1056,5	2113,0	4226,0	8451,7

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende bestimmt. Die gemessenen Werte des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 56 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine letalen und nur bei maximal 6% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 4-20 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab Konzentration 6 (1056,5 µmol/L) konzentrations- und zeitabhängig zu. Auf Basis der koagulierten Embryonen wurde eine LC₅₀(48h) von 1428,5 µmol/L (r^2 : 0,998; b: 5,208; LC₁₀: 811,3 µmol/L) berechnet.

Tabelle 4-20: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (1: 33,1 µmol/L; 2: 66 µmol/L; 3: 132 µmol/L; 4: 264,1 µmol/L; 5: 528,3 µmol/L; 6: 1056,5 µmol/L; 7: 2113 µmol/L; 8: 4226 µmol/L; 9: 8451,7 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration									
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20/20
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	20/20	20/20
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	20/20	20/20
	24	-	-	-	-	-	-	-	9/21	20/20	20/20
	36	-	-	-	-	-	-	-	9/21	20/20	20/20
	48	-	-	-	-	-	-	5/20	17/21	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	-	-	-	-	-	25	81	100	100

Die während der 48- stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 4-21 zusammenfassend dargestellt. Nach 8 Stunden zeigten einzelne Embryonen einen verzögerten Gastrulationsbeginn. Es waren zudem Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Somiten, Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule zu beobachten. Die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und der Pigmentierung waren ab Konzentration 3 (132 $\mu\text{mol/L}$) beeinträchtigt, auch waren ab dieser Konzentration Ödeme zu beobachten. Ab Konzentration 5 (528,3 $\mu\text{mol/L}$) zeigten sich Effekte auf die Otolithen, wobei Embryonen sowohl drei als auch keine Otolithen in den Sacculi angelegt hatten.

Tabelle 4-21: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (1: 33,1 µmol/L; 2: 66 µmol/L; 3: 132 µmol/L; 4: 264,1 µmol/L; 5: 528,3 µmol/L; 6: 1056,5 µmol/L; 7: 2113 µmol/L; 8: 4226 µmol/L; 9: 8451,7 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration									
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	1/20	-	-	2/20	koa	koa
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	-	-	-	8/12	koa	koa
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	-	1/15	4/4	koa	koa
Keine / deformierte Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	-	6/20	11/12	koa	koa
	36	-	-	-	-	-	-	6/20	4/4	koa	koa
	48	-	-	-	-	1/20	15/20	14/15	4/4	koa	koa
keine / deformierte Augenanlage	24	-	-	1/20	2/20	2/20	-	1/20	11/12	koa	koa
	36	-	-	-	-	-	-	1/20	4/4	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	-	1/15	4/4	koa	koa
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	-	-	10/12	koa	koa
	36	-	-	-	-	-	-	-	4/4	koa	koa
	48	1/36	-	-	-	-	-	-	4/4	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	1/20	-	2/20	1/20	-	12/20	12/12	koa	koa
	36	-	1/20	-	-	-	-	12/20	4/4	koa	koa
	48	-	1/20	-	-	12/20	20/20	15/15	4/4	koa	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	1/20	-	-	-	3/20	14/20	8/12	koa	koa
	36	-	1/20	-	-	-	3/20	14/20	4/4	koa	koa
	48	-	1/20	-	-	12/20	20/20	15/15	4/4	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	8/20	20/20	20/20	4/4	koa	koa
	48	-	-	-	-	1/20	18/20	15/15	4/4	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	5/20	19/20	20/20	20/20	4/4	koa	koa
	48	1/36	-	-	-	16/20	20/20	15/15	4/4	koa	koa
keine Pigmentierung	48	2/36	-	-	1/20	-	-	2/15	2/4	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	1/36	-	-	1/20	-	20/20	13/15	2/4	koa	koa
Dotterödem	48	-	-	-	5/20	17/20	20/20	15/15	3/4	koa	koa
Perikardödem	48	-	-	-	3/20	17/20	20/20	14/15	3/4	koa	koa
gesamt	48	-	-	-	5/20	17/20	20/20	15/15	3/4	koa	koa
keine oder deformierte Otolithen	48	1/36	-	-	-	-	2/20	2/15	4/4	koa	koa

Wie Abbildung 4-4 zu entnehmen ist, zeigte sich ab Konzentration 4 (264,1 µmol/L) eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunnetts-Test wurden eine NOEC von 132,0 µmol/L sowie eine LOEC von 264,1 µmol/L ermittelt.

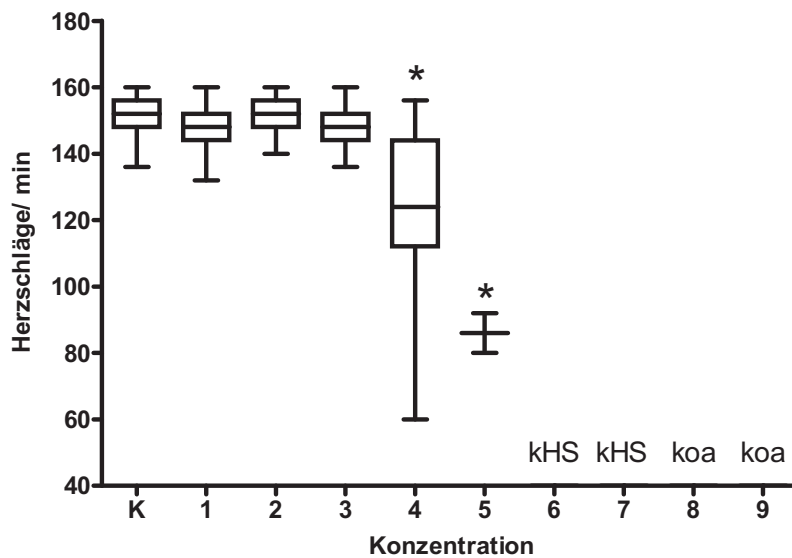


Abbildung 4-4: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden $LC_{20}(48h)$ -Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts- Test; 1: 33,1 $\mu\text{mol/L}$; 2: 66 $\mu\text{mol/L}$; 3: 132 $\mu\text{mol/L}$; 4: 264,1 $\mu\text{mol/L}$; 5: 528,3 $\mu\text{mol/L}$; 6: 1056,5 $\mu\text{mol/L}$; 7: 2113 $\mu\text{mol/L}$; 8: 4226 $\mu\text{mol/L}$; 9: 8451,7 $\mu\text{mol/L}$; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 4-22 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-22: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen).

	Zeit[h]	[µmol/L]
LC ₅₀ koa	48	1428,5
EC ₅₀ kein Herzschlag	48	389,9
EC ₅₀ kein Blutkreislauf	48	212,9
EC ₅₀ Ödeme	48	173,6
EC ₅₀ Pigmentierung	48	373,5
EC ₅₀ Somitenanlage	48	431,32
EC ₅₀ Schwanzablösung	48	1427,9
EC ₅₀ Augendeformation	48	1427,9
EC ₅₀ Kopfdeformation	48	1472,5
EC ₅₀ Schwanzdeformation	48	250,4
EC ₅₀ Wirbelsäulendeformation	48	250,4
EC ₅₀ Otolithen	48	1393,4
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	132,0
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	264,1

4.1.1.2.3 Basierend auf den koagulierten Embryonen, ohne Paracetamol – beobachtete Effekte

In diesen Ansatz wurden die in Tabelle 4-23 zusammengefassten Konzentrationen der Mischung untersucht.

Tabelle 4-23: Testkonzentrationen untersuchten Mischung der Analgetika ohne Paracetamol. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt.

Substanz	Konzentration					
	1	2	3	4	5	6
ASS	9,7	19,4	38,8	77,6	155,1	310,2
Diclofenac	4,6	9,3	18,5	37,1	74,2	148,3
Ibuprofen	4,6	9,3	18,6	37,2	74,4	148,7
Naproxen	6,2	12,4	24,7	49,4	98,9	197,7
Gesamtkonzentration [µmol/L]	25,1	50,4	100,6	201,3	402,6	804,9

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende bestimmt. Die gemessenen Werte für Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. In Konzentration 6 (804,9 µmol/L) lag zu Testbeginn der pH-Wert bei 4,72, so dass eine Beeinflussung der Embryonen durch den geringen pH nicht ausgeschlossen werden kann. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 57 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 4-24 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab Konzentration 3 (100,6 µmol/L) konzentrations- und zeitabhängig zu. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 131,7 µmol/L (r^2 : 0,993; b: 4,708; LC₁₀: 70,4 µmol/L) berechnet.

Tabelle 4-24: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (1: 25,1 µmol/L; 2: 50,4 µmol/L; 3: 100,6 µmol/L; 4: 201,3 µmol/L; 5: 402,6 µmol/L; 6: 804,9 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration						
		K	1	2	3	4	5	6
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-	20/20
	8	-	-	-	-	-	-	20/20
	12	-	-	-	-	-	-	20/20
	24	-	-	-	-	12/20	20/20	20/20
	36	-	-	-	-	16/20	20/20	20/20
	48	-	-	-	6/20	16/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	-	-	30	80	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 4-25 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Somiten, Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule. Eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme konnten bis in die niedrigste untersuchte Konzentration beobachtet werden. Die Entwicklung der Pigmentierung war ab Konzentration 2 (50,4 µmol/L) beeinträchtigt. In Konzentration 2 (50,4 µmol/L) hatte nach 48 Stunden ein Keim drei Otolithen pro Sacculus angelegt, während in Konzentration 4 (201,3 µmol/L) zwei Embryonen die Otolithen fehlten.

Tabelle 4-25: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (1: 25,1 µmol/L; 2: 50,4 µmol/L; 3: 100,6 µmol/L; 4: 201,3 µmol/L; 5: 402,6 µmol/L; 6: 804,9 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert, -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration							
		K	1	2	3	4	5	6	
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	5/8	koa	koa	
	36	-	-	-	-	1/4	koa	koa	
	48	-	-	1/20	-	3/4	koa	koa	
keine oder deformierte Somitenanlage	24	-	-	-	2/20	8/8	koa	koa	
	36	-	-	-	2/20	4/4	koa	koa	
	48	-	1/20	10/20	14/14	4/4	koa	koa	
deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	6/8	koa	koa	
	36	-	-	-	-	2/4	koa	koa	
	48	-	-	-	-	2/4	koa	koa	
deformierter Kopf	24	-	-	-	1/20	5/8	koa	koa	
	36	-	-	-	1/20	1/4	koa	koa	
	48	-	-	-	-	2/4	koa	koa	
deformierter Schwanz	24	-	-	-	3/20	8/8	koa	koa	
	36	-	-	-	3/20	4/4	koa	koa	
	48	-	10/20	20/20	14/14	4/4	koa	koa	
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	3/20	14/20	8/8	koa	koa	
	36	-	-	3/20	14/20	4/4	koa	koa	
	48	-	10/20	20/20	14/14	4/4	koa	koa	
kein Herzschlag	36	-	-	20/20	20/20	4/4	koa	koa	
	48	-	-	11/20	14/14	4/4	koa	koa	
kein Blutkreislauf	36	-	19/20	20/20	20/20	4/4	koa	koa	
	48	-	16/20	20/20	14/14	4/4	koa	koa	
keine Pigmentierung	48	-	-	-	-	2/4	koa	koa	
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	14/20	14/14	2/4	koa	koa	
Dotterödem	48	-	19/20	20/20	12/14	3/4	koa	koa	
Perikardödem	48	-	18/20	20/20	12/14	3/4	koa	koa	
gesamt	48	-	19/20	20/20	12/14	3/4	koa	koa	
keine oder deformierte Otolithen	48	-	-	1/20	-	2/4	koa	koa	

Wie Abbildung 4-5 zu entnehmen ist, zeigte sich außerdem eine Beeinflussung der Herzschlagfrequenz. Da bis in die niedrigste untersuchte Konzentration eine Reduktion der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurde, ist eine Angabe der NOEC nicht möglich. Die LOEC entspricht der niedrigsten untersuchten Konzentration von 25,1 µmol/L.

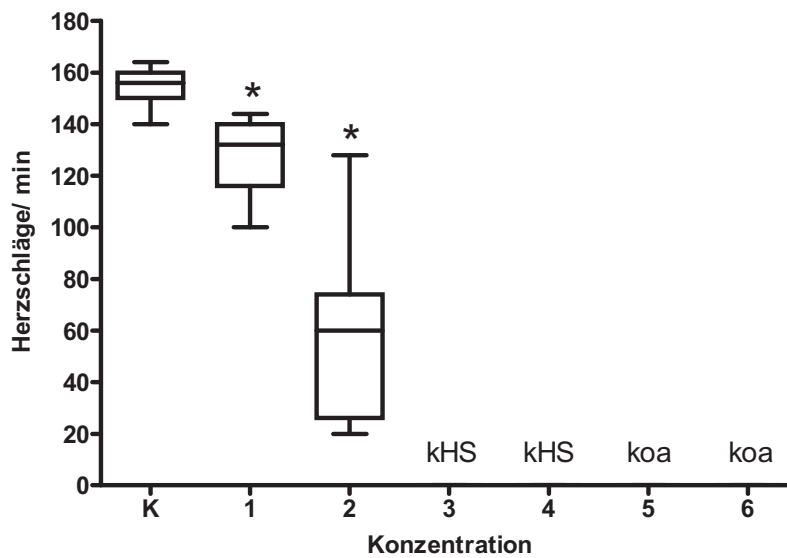


Abbildung 4-5: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; 1: $25,1 \mu\text{mol/L}$; 2: $50,4 \mu\text{mol/L}$; 3: $100,6 \mu\text{mol/L}$; 4: $201,3 \mu\text{mol/L}$; 5: $402,6 \mu\text{mol/L}$; 6: $804,9 \mu\text{mol/L}$; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 4-26 zusammengestellt.

Tabelle 4-26: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Analgetika ohne Paracetamol. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen; oP: ohne Paracetamol).

	Zeit[h]	[μ mol/L]
LC ₅₀ koa (oP)	48	131,7
EC ₅₀ kein Herzschlag	48	49,0
EC ₅₀ kein Blutkreislauf	48	13,6
EC ₅₀ Ödeme	48	32,0
EC ₅₀ Pigmentierung	48	45,5
EC ₅₀ Somitenanlage	48	50,1
EC ₅₀ Schwanzablösung	48	177,8
EC ₅₀ Augendeformation	48	201,3
EC ₅₀ Kopfdeformation	48	201,3
EC ₅₀ Schwanzdeformation	48	25,1
EC ₅₀ Wirbelsäulendeformation	48	25,1
EC ₅₀ Otolithen	48	201,2
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	-
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	25,1

4.1.1.2.4 Hauptversuche Analgetika- zusammenfassende Darstellung

Es wurden, wie in den Vorversuchen auch, drei unterschiedliche Mischungen der Analgetika untersucht. In einer Mischung wurde die LC₂₀(48h) der Einzelstoffe als Grundlage für die Mischung verwendet, die auf Basis aller vier letalen Endpunkte berechnet wurde. Für die übrigen beiden Versuche wurde dagegen die LC₂₀(48h) der Einzelstoffe eingesetzt, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen ermittelt wurde. In einem der beiden Versuche wurden alle fünf Analgetika, ASS, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol, als Mischung untersucht; in dem anderen Test vier Substanzen, ohne Paracetamol.

Letale Effekte

Eine Vorhersage nach dem Konzept der *Unabhängigen Wirkung* konnte für alle drei Versuche aufgrund der steilen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe nur für die höchste untersuchte Konzentration erfolgen. Das Konzept der *Unabhängigen Wirkung* sagt für diese in den basierend auf allen vier letalen Endpunkten und basierend auf den koagulierten Embryonen jeweils einen Effekt von 67,3%, für den Versuch basierend auf den koagulierten Embryonen, ohne Paracetamol einen Effekt von 59,4% voraus. Tatsächlich zeigten jedoch in allen drei Tests in den höchsten untersuchten Konzentrationen 100% der eingesetzten Embryonen letale Effekte. Das Konzept der *Unabhängigen Wirkung* unterschätzt damit die zu erwartende Mischungstoxizität.

In den Abbildung 4-6, Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8 sind die beobachtete Mortalität der drei durchgeführten Versuche (schwarz) und die Vorhersagen nach dem Konzept der

Konzentrationsadditivität (rot) zusammenfassend dargestellt. Wie den Abbildungen zu entnehmen ist zeigte sich in allen drei Versuchen eine tendenziell mehr als additive Mischungstoxizität, wobei die Unterschiede zwischen beobachteter und vorhergesagter Mortalität in der Reihenfolge Ana aEP (Abbildung 4-6) > Ana koa (Abbildung 4-7) > Ana koa oP (Abbildung 4-8) zunahmen. Auch wenn die Unterschiede weniger deutlich als in den Vorversuchen sind, so zeigt sich doch anhand der Graphen ein Effekt der Wahl des Endpunktes auf das Ergebnis von Kombinationsexperimenten.

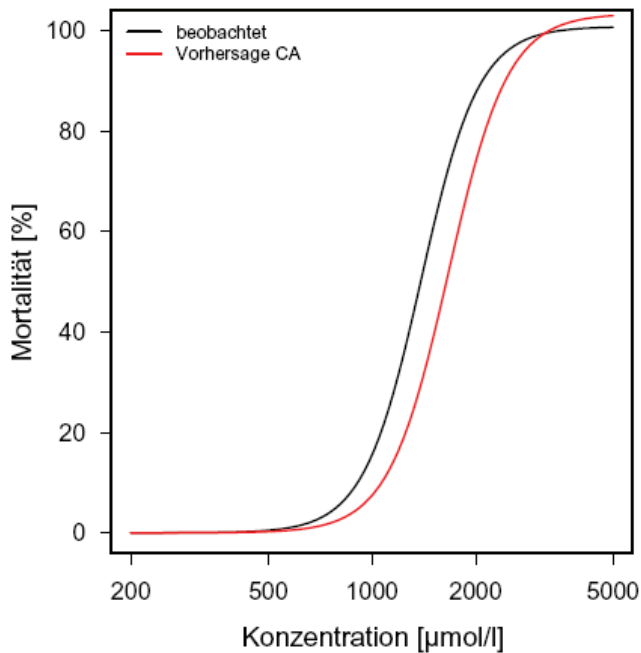


Abbildung 4-6: Darstellung der beobachteten Mortalität der Mischung der Analgetika (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA, rot). Die zugrundeliegenden $LC_{20}(48h)$ -Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet

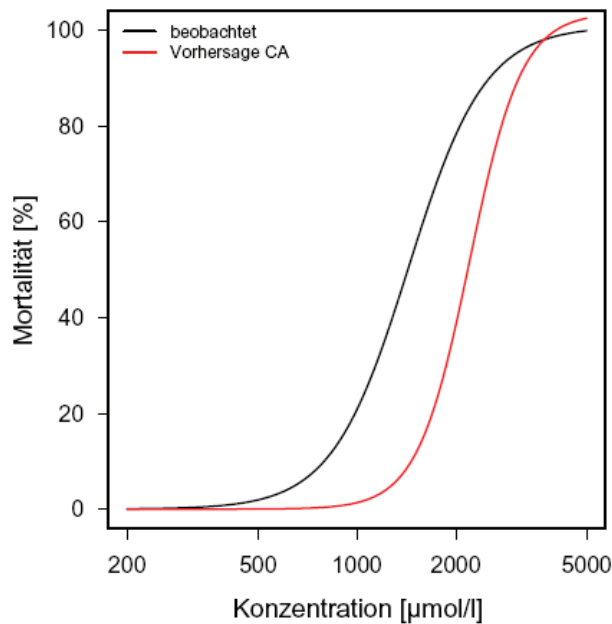


Abbildung 4-7: Darstellung der beobachteten Mortalität der Mischung der Analgetika (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA; rot). Für die Berechnung der zugrundeliegenden $LC_{20}(48h)$ -Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt

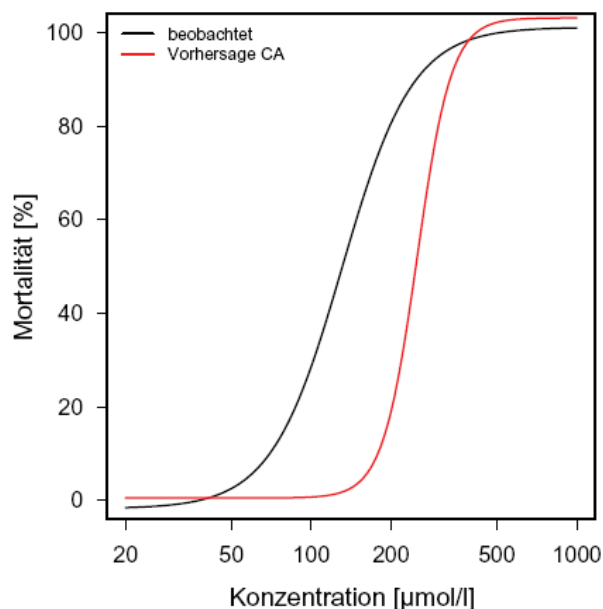


Abbildung 4-8: Darstellung der beobachteten Mortalität der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA; rot). Für die Berechnung der zugrundeliegenden $LC_{20}(48h)$ -Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt.

In Tabelle 4-27 sind die, anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten und die nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA) vorhergesagten LC₅₀-Werte für alle drei durchgeführten Versuche zusammengestellt. Wie anhand der Abbildung 4-6, Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8 zu erwarten war, lagen die berechneten LC₅₀-Werte der einzelnen Mischungen unter den, nach CA vorhergesagten Werten. Zudem gab es bei den 95% Vertrauensintervallen keine Überschneidungen zwischen Beobachtung und Vorhersage, so dass auch das Konzept der *Konzentrationsadditivität* die Toxizität der einzelnen Mischungen unterschätzt. Die Unterschiede zwischen Beobachtung und Vorhersage sind jedoch gering (Faktor <2), so dass man von einer additiven Mischungstoxizität der Analgetika in allen drei Versuchen ausgehen kann.

Tabelle 4-27: Darstellung der anhand der beobachteten Effekte berechneten und der nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagten LC₅₀(48h)-Werte (95% Vertrauensintervalle) sowie den „Spacing“-Faktoren zwischen Vorhersage und Beobachtung (Ana aEP: Versuch basierend auf der LC₂₀(48h), die mit allen vier letalen Endpunkten ermittelt wurde; Ana koa: Versuch basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen ermittelt wurde; Ana koa oP: . Versuch ohne Paracetamol basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen ermittelt wurde).

Test	LC ₅₀ (48h), [µmol/L] <i>beobachtet</i>	LC ₅₀ (48h), [µmol/L] <i>Vorhersage CA</i>	Faktor
Ana aEP	1349,8 (1256 – 1452,2)	1678,2 (1671,2 – 1685,4)	1,2
Ana koa	1428,5 (1410,5 – 1446,6)	2215,8 (2204,7 – 2226,9)	1,6
Ana koa oP	131,7 (126,1 – 137,5)	251,5 (250,6 – 252,5)	1,9

Es lässt sich auch anhand der berechneten letalen Konzentrationen feststellen, dass die Unterschiede zwischen Beobachtung und Vorhersage in der Reihenfolge Ana aEP > Ana koa > Ana koa oP zunehmen. Damit zeigt sich auch in den Hauptversuchen ein Einfluss der Wahl des Endpunktes auf das Ergebnis von Kombinationsexperimenten, wenn auch nicht in so deutlichem Umfang wie in den Vorversuchen. Die Unterschiede zwischen Ana koa und Ana koa oP könnten für einen dämpfenden Einfluss von Paracetamol sprechen (siehe dazu auch subletale Effekte der Mischungen).

Vergleicht man die ermittelten LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischung so zeigt, sich, dass in den beiden Versuchen Ana aEP und Ana koa die Toxizität der Mischung zwischen den Werten der Einzelstoffe mit der größten und kleinsten Toxizität liegt. Beide Mischungen waren weniger toxisch als die Einzelstoffe ASS, Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen, jedoch toxischer als der Einzelstoff Paracetamol. Die Mischung der Analgetika ohne Paracetamol (Ana koa oP) war dagegen überraschenderweise toxischer ist als die

Einzelstoffe ASS, Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen (Tabelle 4-28), was wiederum für einen dämpfenden Einfluss von Paracetamol spricht.

Tabelle 4-28: Darstellung der berechneten LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischungen der Analgetika (aEP: Versuch, in dem alle vier letalen Endpunkten berücksichtigt wurden; ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; koa: Versuch, in dem ausschließlich die koagulierten Embryonen als letal gewertet wurden; koa oP: Versuch ohne Paracetamol, in dem ausschließlich die koagulierten Embryonen als letal gewertet wurden; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol).

	LC ₅₀ (48h); [µmol/L]					
	ASS	Dic	Ibu	Nap	Para	Mix
aEP	243,6	9,7	111,0	154,5	8021,6	1349,8
koa	345,5	192,6	200,5	237,1	12071,6	1428,5
koa oP	345,5	192,6	200,5	237,1	-	131,7

Für alle fünf Substanzen werden in der Literatur ähnliche Wirkmechanismen im Säuger beschrieben. Ihre Wirkung basiert auf der Hemmung der Cyclooxygenase- oder COX-Enzyme, welche die Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen katalysieren. Beim Säuger werden sowohl die erwünschten analgetischen, antipyretischen und antiphlogistischen Wirkungen als auch ein Großteil der unerwünschten Nebenwirkungen auf diesen Wirkmechanismus zurückgeführt (Fent et al., 2006; Forth et al., 2001). COX-Enzyme und auch Prostaglandine sind in Fischen nachgewiesen worden (Zou et al., 1999). Es ist jedoch nicht geklärt, ob sie in diesen Organismen die gleiche Funktion erfüllen, wie im Säuger und ab welchem Entwicklungsstadium sie vorhanden sind. Daher ist zudem unklar, ob die Analgetika im Fisch den selben Wirkmechanismus wie im Säuger haben. Aufgrund der Literaturdaten für den Säuger wurde jedoch eine additive Mischungstoxizität erwartet und die erhaltenen Ergebnisse haben diese Erwartung auch bestätigt.

Cleuvers (2004) beschreibt für eine Mischung aus Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen in Tests mit Algen und Daphnien ähnliche, wie die beobachteten Effekte. In beiden Versuchsansätzen wurde die Mischungstoxizität der genannten Substanzen mit dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* genau vorhergesagt. Ebenso zeigte sich ein deutlicher Effekt der Mischung trotz keiner bzw. geringer Effekte der eingesetzten Konzentrationen in den Einzelsubstanzversuchen (jeweils ¼ der einzelnen LC_x-Konzentrationen). Als einheitlichen Endpunkt hat er in seinen Untersuchungen die Immobilisierung von Daphnien und die Wachstumshemmung bei Algen verwendet. Über QSAR-Berechnungen kommt er zu dem Schluss, dass alle vier Substanzen einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzen und daher additiv wirken. Die Wirkung kommt seiner Meinung nach jedoch über Narkose und nicht über einen spezifischen Wirkmechanismus zustande.

Subletale Effekte

Betrachtet man die subletalen Effekte so zeigten sich ähnliche Effekte, wie in den Einzelsubstanzversuchen. Vergleicht man die ermittelten EC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe

und der Mischung so zeigt, sich, dass im Versuch Ana aEP die Toxizität der Mischung zwischen den Werten der Einzelstoffe mit der größten und kleinsten Toxizität liegt (Tabelle 4-29). Die Mischung ist damit auch in bezug auf die subletalen Effekte weniger toxisch als die Einzelstoffe ASS, Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen, jedoch toxischer als der Einzelstoff Paracetamol.

Bei der Mischung Ana koa zeigten sich zumindest für einige Endpunkte $EC_{50}(48h)$ -Werte im Bereich der der Einzelstoffe (in Tabelle 4-30rot dargestellt). Die Mischung ist damit jedoch auch in bezug auf die subletalen Effekte weniger toxisch als die Einzelstoffe ASS, Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen, jedoch toxischer als der Einzelstoff Paracetamol.

Für die Mischung der Analgetika ohne Paracetamol (Ana koa oP) ergaben sich Werte im Bereich der der Einzelstoffe, zum Teil war jedoch auch die Mischung toxischer als die Einzelstoffe ASS, Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen (Tabelle 4-31), was wiederum für einen dämpfenden Einfluss von Paracetamol spricht.

Tabelle 4-29: Berechnete Effektkonzentrationen für die Versuche mit den Einzelstoffen und der Mischung, bei denen jeweils alle vier letalen Endpunkte für die Berechnung der LC_x -Werte berücksichtigt wurden (ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; -: keine Angabe möglich).

aEP	ASS	Dic	Ibu	Nap	Para	Mix
EC_{50} kein Herzschlag	236,1	9,86	111,7	356,0	7774,8	1553,5
EC_{50} kein Blutkreislauf	233,2	3,37	64,4	106,9	3878,6	800,8
EC_{50} Ödeme	-	3,64		125,2	4545,4	668,8
EC_{50} Pigmentierung	205,5	51,76	134	-	1650,7	1042,2
EC_{50} Somitenanlage	-	-		-	-	-
EC_{50} Schwanzablösung	333,8	-		-	-	-
EC_{50} Augendeformation	-	-	230,4	-	8766,4	-
EC_{50} Kopfdeformation	-	-	241,2	-	5915,1	-
EC_{50} Schwanzdeformation	302,4	4,21	120,2	-	4713,5	1079,1
EC_{50} Wirbelsäulendef.	-	4,82		-	5680,3	1079,1
EC_{50} Otolithen	286	-	115,7	-	7888,8	-
NOEC (Herzschlag)	-	2,79	23,7	80,6	2513,2	194,9
LOEC (Herzschlag)	155	6,74	47,4	161,1	5780,4	388,9

Tabelle 4-30: Berechnete Effektkonzentrationen für die Versuche mit den Einzelstoffen und der Mischung, bei denen ausschließlich die koagulierten Embryonen für die Berechnung der LC_x-Werte berücksichtigt wurden (aE: alle eingesetzten Embryonen zeigen diesen Effekt; ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; -: keine Angabe möglich).

koa	ASS	Dic	Ibu	Nap	Para	Mix
EC ₅₀ kein Herzschlag	236,1	aE	137,4	260,4	7108,5	389,9
EC ₅₀ kein Blutkreislauf	233,2	aE	62,8	152,2	3207,7	212,9
EC ₅₀ Ödeme	-	-	62,7	153,3	3207,7	173,6
EC ₅₀ Pigmentierung	205,5	aE	90,0	188,3	aE	373,5
EC ₅₀ Somitenanlage	-	aE	-	-	17756,7	431,3
EC ₅₀ Schwanzablösung	333,8		166,0	-	17756,7	1427,9
EC ₅₀ Augendeformation	-		234,8	254,0	8111,9	1427,9
EC ₅₀ Kopfdeformation	-		201,1	261,9	8878,4	1472,5
EC ₅₀ Schwanzdeformation	302,4	aE	116,6	152,8	4224,9	250,4
EC ₅₀ Wirbelsäulendef.	-	aE	126,7	197,3	5383,9	250,4
EC ₅₀ Otolithen	286	aE	151,8	246,2	9231,2	1393,4
NOEC (Herzschlag)	-	-	35,6	107,4	2513,2	132,0
LOEC (Herzschlag)	155	78,6	71,1	161,1	5026,5	264,1

Tabelle 4-31: Berechnete Effektkonzentrationen für die Versuche mit den Einzelstoffen und der Mischung ohne Paracetamol, bei denen ausschließlich die koagulierten Embryonen für die Berechnung der LC_x-Werte berücksichtigt wurden (aE: alle eingesetzten Embryonen zeigen diesen Effekt; ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; -: keine Angabe möglich).

koa oP	ASS	Dic	Ibu	Nap	Mix
EC ₅₀ kein Herzschlag	236,1	aE	137,4	260,4	49,0
EC ₅₀ kein Blutkreislauf	233,2	aE	62,8	152,2	13,6
EC ₅₀ Ödeme	-	-	62,7	153,3	32,0
EC ₅₀ Pigmentierung	205,5	aE	90,0	188,3	45,5
EC ₅₀ Somitenanlage	-	aE	-	-	50,1
EC ₅₀ Schwanzablösung	333,8		166,0	-	177,8
EC ₅₀ Augendeformation	-		234,8	254,0	201,3
EC ₅₀ Kopfdeformation	-		201,1	261,9	201,3
EC ₅₀ Schwanzdeformation	302,4	aE	116,6	152,8	25,1
EC ₅₀ Wirbelsäulendef.	-	aE	126,7	197,3	25,1
EC ₅₀ Otolithen	286	aE	151,8	246,2	201,2
NOEC (Herzschlag)	-	-	35,6	107,4	-
LOEC (Herzschlag)	155	78,6	71,1	161,1	25,1

Die Tatsache, dass ähnliche subletale Effekte bei allen drei Mischungen und die deutlichsten Effekte im Versuch ohne Paracetamol zu beobachten waren, wird durch Abbildung 4-9 noch einmal verdeutlicht.

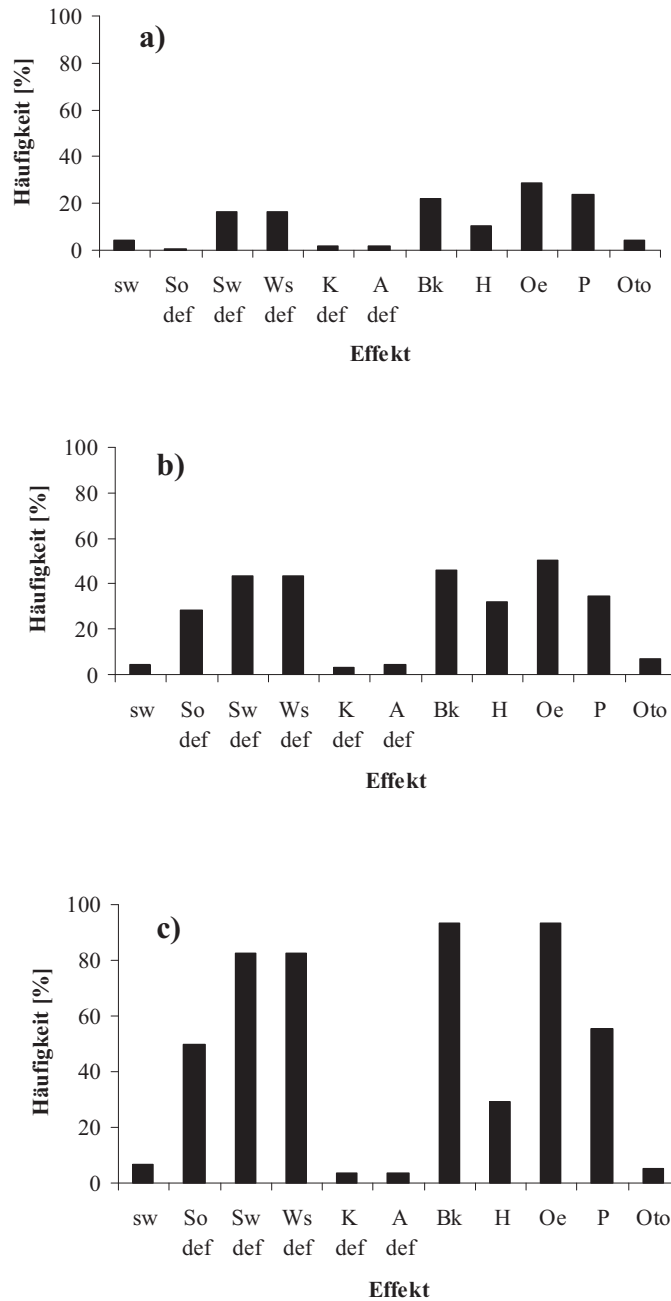


Abbildung 4-9: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Mischungen der Analgetika a) basierend auf der $LC_{20}(48h)$ der Einzelstoffe, die mit allen vier letalen Endpunkten berechnet wurde b) basierend auf der $LC_{20}(48h)$ der Einzelstoffe, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde c) ohne Paracetamol, basierend auf der $LC_{20}(48h)$ der Einzelstoffe, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

Sowohl in den Vor- als auch in den Hauptversuchen zeigte sich ein Einfluss der Wahl des Endpunktes auf das Ergebnis von Kombinationsexperimenten. Es wurde daher die Entscheidung getroffen bei Fragestellungen, bei denen der Wirkmechanismus von Substanzen entscheidend ist, sich auf die koagulierten Embryonen als letalen Endpunkt zu beschränken. Es wurden aus diesem Grunde für die übrigen untersuchten Substanzen (Einzelstoffe und Mischungen) ausschließlich die koagulierten Embryonen als letal gewertet um einen einheitlichen Endpunkt für die folgenden Kombinationsexperimente zu haben und die Varianz zu minimieren.

4.1.2 Pflanzenschutzmittel (PSM)

4.1.2.1 Beobachtete Effekte

Es wurden die drei Acetylcholinesterase(AChE)-hemmer, Carbaryl, Malathion und Parathion, als Mischung untersucht. Es wurden ausgehend von der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen die, in Tabelle 4-32 zusammengestellten Konzentrationen getestet.

Tabelle 4-32: Testkonzentrationen der Kombination AChE-hemmer.

Substanz	Konzentration								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carbaryl	1,2	1,8	2,7	4,0	6,0	9,0	13,6	20,4	30,5
Malathion	0,8	1,2	1,9	2,8	4,2	6,3	9,4	14,1	21,1
Parathion	1,1	1,6	2,4	3,6	5,4	8,0	12,0	18,1	27,1
Gesamtkonzentration [µmol/L]	3,1	4,6	7,0	10,4	15,6	23,3	35,0	52,6	78,7

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende bestimmt. Die gemessenen Werte des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 59 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine letalen und nur bei maximal 2,8% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte zu beobachten waren.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 4-33 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab Konzentration 7 (35 µmol/L) konzentrations- und zeitabhängig zu. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 51,5 µmol/L (r^2 : 0,911; b: 8,329; LC₁₀: 36,2 µmol/L) berechnet.

Tabelle 4-33: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der AChE-Hemmer (1: 3,1 $\mu\text{mol/L}$; 2: 4,6 $\mu\text{mol/L}$; 3: 7 $\mu\text{mol/L}$; 4: 10,4 $\mu\text{mol/L}$; 5: 15,6 $\mu\text{mol/L}$; 6: 23,3 $\mu\text{mol/L}$; 7: 35 $\mu\text{mol/L}$; 8: 52,6 $\mu\text{mol/L}$; 9: 78,7 $\mu\text{mol/L}$; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration									
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15/20
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18/20
	24	-	1/20	1/20	1/20	1/21	-	-	1/20	11/20	18/20
	36	-	1/20	1/20	1/20	1/21	-	-	1/20	11/20	19/20
	48	-	1/20	1/20	1/20	1/21	-	-	1/20	11/20	19/20
gesamt [%]	48	-	5	5	5	4,8	-	-	5	55	95

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 4-34 zusammenfassend dargestellt. Es zeigte sich, mit Ausnahme von Konzentration 2 (4,6 $\mu\text{mol/L}$), in allen Konzentrationen nach 8 Stunden eine Verzögerung des Gastrulationsbeginns. Vereinzelt zeigten sich Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule. Ab Konzentration 3 (7 $\mu\text{mol/L}$) zeigten sich eine Beeinträchtigung der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme. Die Entwicklung der Pigmentierung war ab Konzentration 2 (4,6 $\mu\text{mol/L}$) beeinträchtigt. In Konzentration 8 (52,6 $\mu\text{mol/L}$) hatte ein Keim keine Otolithen in den Sacculi angelegt.

Tabelle 4-34: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der AChE-Hemmer (1: 3,1 µmol/L; 2: 4,6 µmol/L; 3: 7 µmol/L; 4: 10,4 µmol/L; 5: 15,6 µmol/L; 6: 23,3 µmol/L; 7: 35 µmol/L; 8: 52,6 µmol/L; 9: 78,7 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration [µmol/L]									
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9
keine Gastrulation	8	-	1/20	-	4/20	1/20	1/20	3/19	2/20	9/20	3/5
	12	-	1/20	-	-	-	-	-	-	-	-
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	-	-	-	1/19	-	1/2
	36	-	-	-	-	-	-	-	1/19	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	1/19	-	-
keine oder deformierte Somiten	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/2
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
keine / deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	-	-	-	1/19	1/9	1/2
	36	-	-	-	-	-	-	-	1/19	1/9	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	1/19	-	-
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	-	-	1/19	2/9	1/2
	36	-	-	-	-	-	-	-	1/19	2/9	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	1/19	1/9	-
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	-	-	1/19	1/9	1/2
	36	-	-	-	-	-	-	-	1/19	1/9	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	1/19	2/9	-
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	-	-	1/19	-	1/2
	36	-	-	-	-	-	-	-	1/19	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	1/19	2/9	-
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/1
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	1/9	-
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	-	-	1/19	-	1/1
	48	-	-	-	2/19	3/19	2/19	10/19	18/19	9/9	1/1
keine Pigmentierung	48	-	-	1/19	-	-	-	1/19	1/19	4/8	-
reduzierte Pigmentierung	48	1/36	-	-	-	3/19	1/19	4/19	11/19	5/9	1/1
Dotterödem	48	1/36	-	-	3/19	4/19	11/20	12/19	19/19	-	1/1
Perikardödem	48	1/36	-	-	3/19	4/19	11/20	12/19	19/19	-	1/1
gesamt	48	1/36	-	-	3/19	4/19	11/20	12/19	19/19	-	1/1
keine Otolithen	48	-	-	-	-	-	-	-	-	1/9	-

Wie Abbildung 4-10 zu entnehmen ist, zeigte sich in den Konzentrationen 1 und 2 (3,1 µmol/L; 4,6 µmol/L) ein leichter, nicht-signifikanter Anstieg der Herzschlagfrequenz, ab Konzentration 5 (15,6 µmol/L) eine signifikante Reduktion. Mittels Dunetts Test wurden eine NOEC von 10,4 µmol/L sowie eine LOEC von 15,6 µmol/L ermittelt.

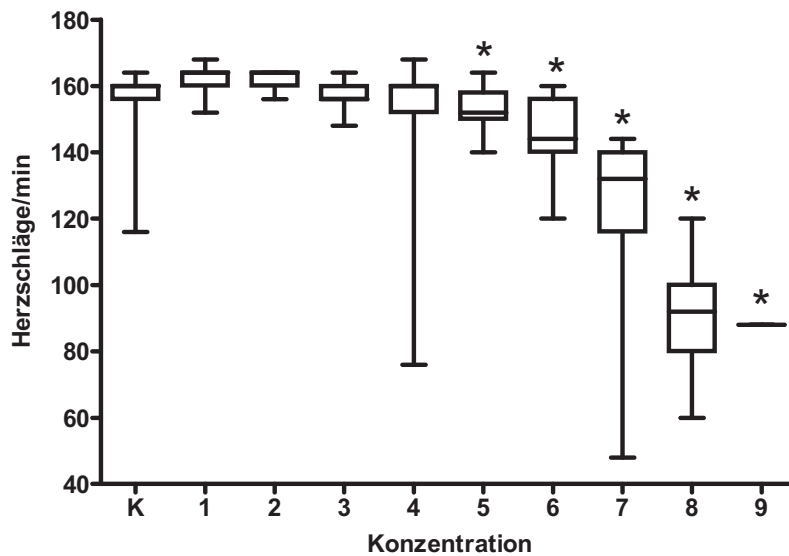


Abbildung 4-10: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung Acetylcholinesterasehemmer basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts- Test; 1: 3,1 $\mu\text{mol/L}$; 2: 4,6 $\mu\text{mol/L}$; 3: 7 $\mu\text{mol/L}$; 4: 10,4 $\mu\text{mol/L}$; 5: 15,6 $\mu\text{mol/L}$; 6: 23,3 $\mu\text{mol/L}$; 7: 35 $\mu\text{mol/L}$; 8: 52,6 $\mu\text{mol/L}$; 9: 78,7 $\mu\text{mol/L}$).

4.1.2.2 Pestizide – zusammenfassende Betrachtung

Es wurde eine Mischung der drei Acetylcholinesterasehemmer Carbaryl, Malathion und Parathion untersucht. Aufgrund, der ähnlichen, in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismen wurde eine additive Mischungstoxizität erwartet.

Letale Effekte

Eine Vorhersage nach dem Konzept der *Unabhängigen Wirkung* konnte aufgrund der steilen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe nur für die höchste untersuchte Konzentration erfolgen. Das Konzept der *Unabhängigen Wirkung* sagt für diese einen Effekt von 48,8% voraus. Tatsächlich zeigten jedoch 95% der eingesetzten Embryonen letale Effekte (Tabelle 4-33). Das Konzept unterschätzt damit, wie erwartet die Toxizität der Mischung.

Die beobachtete und die nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagte Mortalität sind in Abbildung 4-11 dargestellt. Anhand der Graphen zeigte sich eine tendenziell weniger als additive Mischungstoxizität.

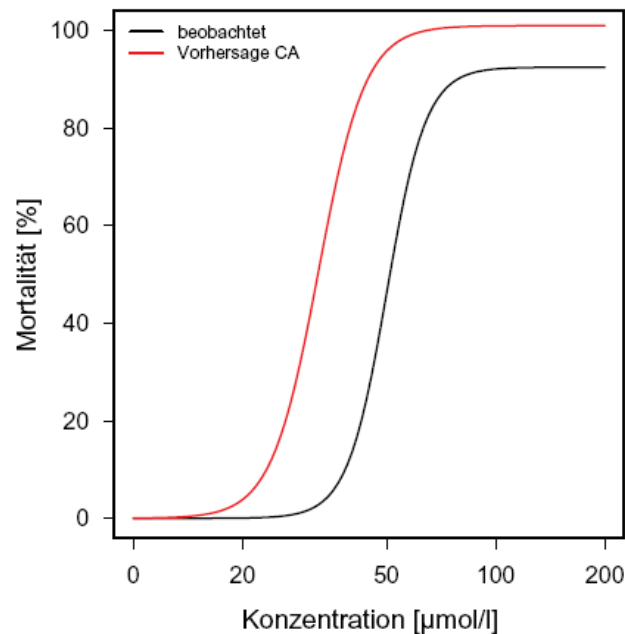


Abbildung 4-11: Darstellung der beobachteten Mortalität der Mischung der AChE-Hemmer (schwarz) mit den Vorhersagen nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA, rot).

In Tabelle 4-35 sind der, anhand der beobachteten letalen Effekte berechnete und der nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA) vorhergesagte LC_{50} -Wert für die untersuchte Mischung dargestellt. Wie anhand der Abbildung 4-11 zu erwarten war, lag der berechnete LC_{50} -Wert der Mischung über dem, nach CA vorhergesagten Wert. Zudem gab es bei den 95% Vertrauensintervallen keine Überschneidungen, so dass auch das Konzept der *Konzentrationsadditivität* die Toxizität der Mischung überschätzt. Die Unterschiede zwischen Beobachtung und Vorhersage sind jedoch gering (Faktor <2), so dass man von einer additiven Mischungstoxizität der Pestizide ausgehen kann.

Tabelle 4-35: Darstellung des anhand der beobachteten Effekte berechneten und des nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagten LC₅₀(48h)-Werts (95% Vertrauensintervalle) sowie des „Spacing“-Faktor zwischen Vorhersage und Beobachtung .

	LC ₅₀ (48h), [µmol/L] <i>beobachtet</i>	LC ₅₀ (48h), [µmol/L] <i>Vorhersage CA</i>	Faktor
AChE-Hemmer	51,5 (48,9 – 54,2)	32,8 (32,1 – 33,5)	1,6

Das Ergebnis bestätigt jedoch z.T. die Ergebnisse aus Vorversuchen mit dem *modified toxic unit approach* (nicht im Detail dargestellt). Hierfür wurden drei Mischungen der Pflanzenschutzmittel auf Basis der LC₅₀(48h) der Einzelstoffe untersucht. In allen drei Untersuchungen zeigte sich, aufgrund von LC₅₀(48h)-Werten von >1 (2.4), eine weniger als additive Mischungstoxizität (Tabelle 4-36).

Tabelle 4-36: Darstellung der berechneten mittleren letalen Konzentrationen (LC₅₀(48h), mit 95% Vertrauensintervall) für die drei Vorversuche mit den PSM nach dem *modified toxic unit approach* (n.b.: nicht bestimmbar aufgrund mathematischer Gründe; oC: Versuch ohne Carbaryl).

	Test 1	Test 2	Test 3 (oC)
LC ₅₀ (48h), TU	1,28 (1,02 – 1,60)	1,33 (n.b.)	1,60 (1,49 – 1,73)

Vergleicht man die ermittelten LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischung so zeigt, sich, dass die Toxizität der Mischung unter den Werten der Einzelstoffe liegt. Die Mischungen war weniger toxisch als die Einzelstoffe Carbaryl, Malathion und Parathion (Tabelle 4-37).

Tabelle 4-37: Darstellung der berechneten LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischungen der PSM .

	LC ₅₀ (48h); [µmol/L]			
	Carbaryl	Malathion	Parathion	Mix
aEP	39,4	25,5	32,5	51,5

Diese Ergebnisse widersprechen damit z.T. den Erwartungen nach den, in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismen und Studiendaten. Overmyer et al. (2003) konnten in Studien an Fliegenlarven, für Mischungen aus Carbaryl und Malathion sowie Carbaryl, Malathion und Chlorpyrifos eine mehr als additive Mischungstoxizität beobachten. Es stellt sich die Frage, ob die geringen Unterschiede im Wirkmechanismus (Carbaryl hemmt das Enzym Acetylcholinesterase durch Carbamylation, während Parathion und Malathion nach metabolischer Aktivierung das Enzym durch Phosphorylierung hemmen) im untersuchten Testsystem bereits ausreichen, um eine (tendenziell) weniger als additive Mischungstoxizität auszulösen.

Subletale Effekte

Betrachtet man die subletalen Effekte nach 48 Stunden, so zeigten sich bei der Exposition gegenüber der Mischung in bezug auf Blutkreislauf, Pigmentierung und Ödeme ähnliche Effekte wie bei den Einzelstoffen (Abbildung 4-12). Deformationen oder Effekte auf die Otolithen wie bei den Einzelstoffen Malathion und Parathion traten jedoch nur vereinzelt auf.

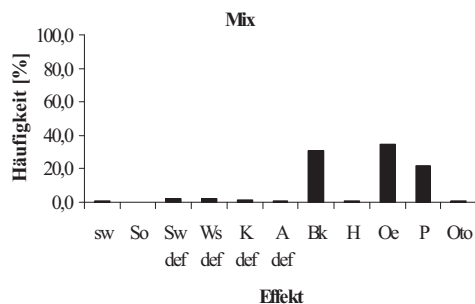
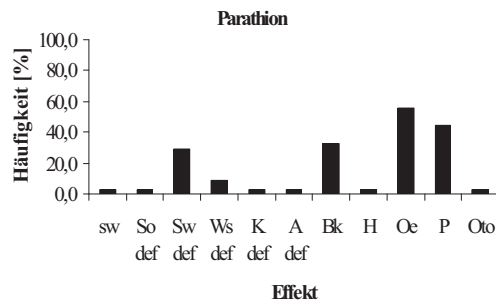
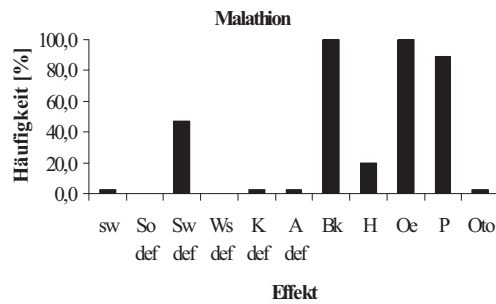
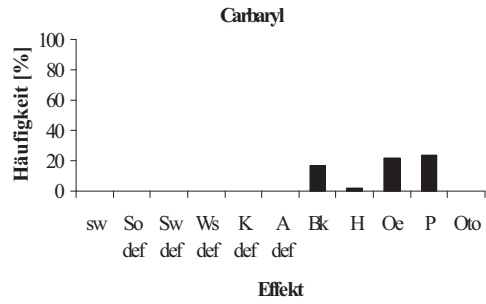


Abbildung 4-12: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Einzelstoffe und der Mischung der AChE-Hemmer (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

Die ermittelte Effektkonzentration für den Parameter „Pigmentierung“ lag etwas über den Werten der Einzelstoffe (Tabelle 4-38). Die übrigen EC₅₀-Werte sowie NOEC und LOEC lagen dagegen im Bereich der Einzelstoffe bzw. darunter (rot).

Tabelle 4-38: Darstellung der ermittelten Effektkonzentrationen der Einzelstoffe und der Mischung der AChE-Hemmer (aE: alle eingesetzten Embryonen zeigen diesen Effekt; -: keine Angabe möglich)

	Carbaryl	Malathion	Parathion	Mischung
EC ₅₀ (48h) kein Herzschlag	-	20,3	42,7	-
EC ₅₀ (48h) kein Blutkreislauf	34,2	aE	29,3	22,0
EC ₅₀ (48h) Ödeme	33,7	aE	20,6	16,1
EC ₅₀ (48h) Pigmentierung	25,5	7,2	24,3	30,1
EC ₅₀ (48h) Schwanzdeformation	-	13,5	29,7	-
EC ₅₀ (48h) Wirbelsäulendeformation	-	-	42,2	-
EC ₅₀ (48h) Otolithen	-	25,4	42,7	-
NOEC (Herzschlagfrequenz)	16,3	-	-	15,5
LOEC (Herzschlagfrequenz)	24,4	9,1	19,0	23,3

In bezug auf die subletalen Effekte ist die Mischung daher als ebenso toxisch wie die Einzelstoffe einzustufen.

4.1.3 Mischung verschiedener Wirkstoffklassen mit unähnlichen Wirkmechanismen

4.1.3.1 Beobachtete Effekte

Es wurde eine Mischung aus Verapamil, Tamoxifen und 17- α -Ethinylöstradiol (EE₂) auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen in den, in Tabelle 4-39 zusammengestellten Konzentrationen untersucht.

Tabelle 4-39: Testkonzentrationen der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen.

Substanz	Konzentration							
	1	2	3	4	5	6	7	8
EE ₂	0,04	0,08	0,2	0,3	0,6	1,2	2,5	4,9
Tamoxifen	0,4	0,8	1,5	3,0	6,0	11,9	24,0	47,9
Verapamil	3,9	7,8	15,6	31,1	62,2	124,4	248,9	497,7
Gesamtkonzentration [μ mol/L]	4,3	8,7	17,3	34,4	68,8	137,5	275,4	550,5

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende bestimmt. Die gemessenen Werte des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem

für den Test zulässigen Bereich. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 58 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden nur bei jeweils 4% der eingesetzten Embryonen letale oder subletale Effekte beobachtet werden konnten.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 4-40 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab Konzentration 6 (137,5 µmol/L) konzentrations- und zeitabhängig zu. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 190,9 µmol/L (r^2 : 0,962; b: 13,978; LC₁₀: 133 µmol/L) berechnet.

Tabelle 4-40: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Substanzen unähnlicher Wirkmechanismen (1: 4,3 µmol/L; 2: 8,7 µmol/L; 3: 17,3 µmol/L; 4: 34,4 µmol/L; 5: 68,8 µmol/L; 6: 137,5 µmol/L; 7: 275,4 µmol/L; 8: 550,5 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration								
		K	1	2	3	4	5	6	7	8
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	2/20	1/20	-	-	2/20	5/20	20/20
	36	-	-	2/20	1/20	-	-	2/20	19/20	20/20
	48	1/26	-	2/20	2/20	-	-	2/20	19/20	20/20
gesamt [%]	48	3,9	-	10	10	-	-	10	95	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 4-41 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich vereinzelt Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter, die Pigmentierung und Deformationen an Somiten, Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule. Deutliche Effekte (>10%) auf das Herzkreislaufsystem und Ödeme traten ab Konzentration 6 (137,5 µmol/L) auf. In Konzentration 6 (137,5 µmol/L) hatten drei Embryonen drei Otolithen pro Sacculus angelegt. In Konzentration 7 (275,4 µmol/L) fehlten dem einzigen nicht-koagulierten Keim die Otolithen in den Sacculi.

Tabelle 4-41: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Substanzen unähnlicher Wirkmechanismen (1: 4,3 µmol/L; 2: 8,7 µmol/L; 3: 17,3 µmol/L; 4: 34,4 µmol/L; 5: 68,8 µmol/L; 6: 137,5 µmol/L; 7: 275,4 µmol/L; 8: 550,5 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration								
		K	1	2	3	4	5	6	7	8
keine Schwanzablösung	24	1/26	-	-	1/19	-	-	-	-	koa
	36	1/26	-	-	1/19	-	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	koa
keine oder deformierte Somitenanlage	24	1/26	-	-	1/19	-	-	-	-	koa
	36	1/26	-	-	1/19	-	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	koa
keine oder deformierte Augenanlage	24	1/26	-	-	1/19	-	-	-	-	koa
	36	1/26	-	-	1/19	-	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	koa
deformierter Kopf	24	1/26	-	-	1/19	-	-	-	1/15	koa
	36	1/26	-	-	1/19	-	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	1/1	koa
deformierter Schwanz	24	1/26	-	-	1/19	-	-	-	8/15	koa
	36	1/26	-	-	1/19	-	-	-	1/1	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	1/1	koa
deformierte Wirbelsäule	24	1/26	-	-	1/19	-	-	-	-	koa
	36	1/26	-	-	1/19	-	-	-	-	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	1/1	koa
kein Herzschlag	36	1/26	-	-	1/19	-	-	-	1/1	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	1/1	koa
kein Blutkreislauf	36	1/26	-	-	1/19	-	-	-	1/1	koa
	48	-	-	-	1/19	2/20	-	13/18	1/1	koa
keine Pigmentierung	48	1/25	-	-	-	-	1/20	-	1/1	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	-	-	-	koa
Dotterödem	48	-	-	-	-	2/20	1/20	14/18	-	koa
Perikardödem	48	-	-	-	-	2/20	1/20	14/18	-	koa
gesamt	48	-	-	-	-	2/20	1/20	14/18	-	koa
keine oder deformierte Otolithen	48	-	-	-	-	-	-	3/18	1/1	koa

Wie Abbildung 4-13 zu entnehmen ist, zeigte sich ab Konzentration 3 (17,3 µmol/L) eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 8,7 µmol/L sowie eine LOEC von 17,3 µmol/L ermittelt.

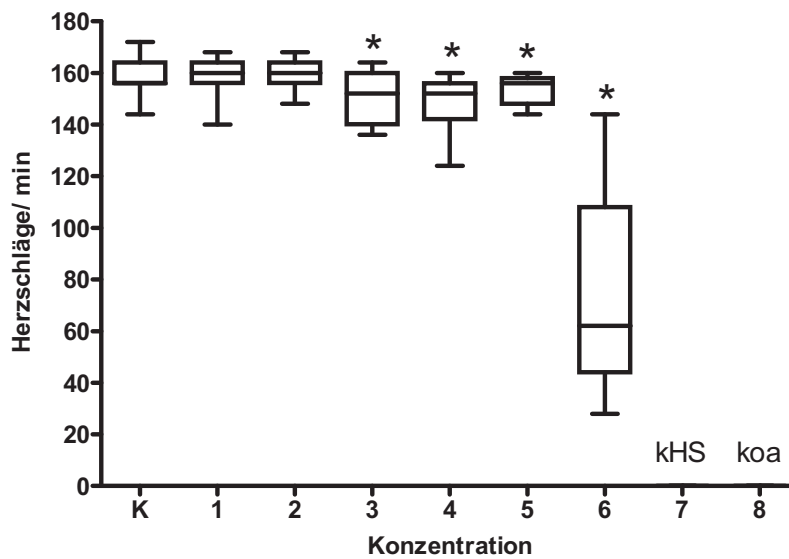


Abbildung 4-13: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; 1: 4,3 $\mu\text{mol/L}$; 2: 8,7 $\mu\text{mol/L}$; 3: 17,3 $\mu\text{mol/L}$; 4: 34,4 $\mu\text{mol/L}$; 5: 68,8 $\mu\text{mol/L}$; 6: 137,5 $\mu\text{mol/L}$; 7: 275,4 $\mu\text{mol/L}$; 8: 550,5 $\mu\text{mol/L}$; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

4.1.3.2 Zusammenfassende Betrachtung

Es wurde eine Mischung aus EE_2 , Tamoxifen und Verapamil untersucht. Aufgrund der unähnlichen in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismen wurde eine weniger als additive Mischungstoxizität erwartet.

Letale Effekte

Eine Vorhersage nach dem Konzept der *Unabhängigen Wirkung* konnte aufgrund der steilen Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Einzelstoffe nur für die höchste untersuchte Konzentration erfolgen. Das Konzept der *Unabhängigen Wirkung* sagt für diese einen Effekt von 48,8% voraus. Tatsächlich zeigten jedoch 100% der eingesetzten Embryonen letale Effekte. Das Konzept unterschätzt damit die Mischungstoxizität.

In Abbildung 4-14 sind die beobachtete Mortalität (schwarz) und die Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (rot) zusammenfassend dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, zeigte sich, entgegen der Erwartung eine additive Mischungstoxizität.

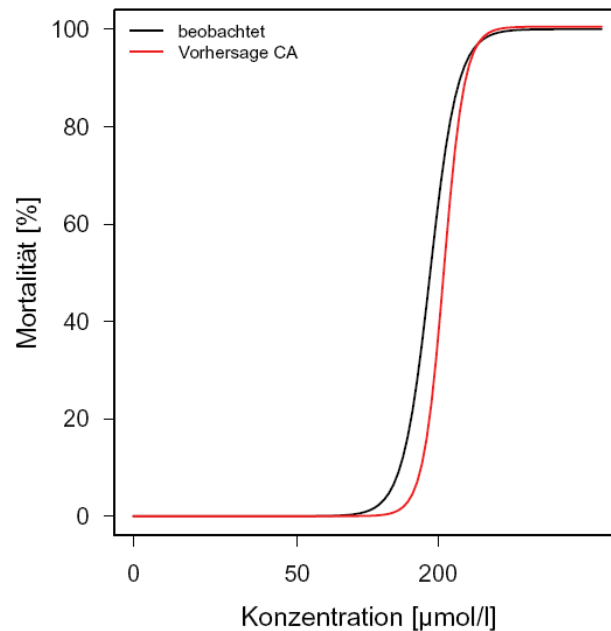


Abbildung 4-14: Vergleich der beobachteten Mortalität der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA; rot).

In Tabelle 4-42 sind der, anhand der beobachteten letalen Effekte berechnete und der nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagte LC_{50} -Wert zusammengestellt. Wie anhand von Abbildung 4-14 zu erwarten war, lagen berechnete und vorhergesagte $LC_{50}(48h)$ in einem ähnlichen Bereich. Zudem gab es Überschneidungen bei den 95% Vertrauensintervallen, so dass das Konzept der *Konzentrationsadditivität*, entgegen der Erwartung, die Mischungstoxizität exakt vorhergesagt hat.

Tabelle 4-42: Darstellung des anhand der beobachteten Effekte berechneten und des nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagten $LC_{50}(48h)$ -Wertes sowie des „Spacing“-Faktors zwischen Beobachtung und Vorhersage.

	$LC_{50}(48h)$, [µmol/L] beobachtet	$LC_{50}(48)$, [µmol/L] Vorhersage CA	Faktor
Mix	190,8 (170,2 – 215,5)	213,95 (213,0 – 214,9)	1,1

Vergleicht man die ermittelten LC₅₀-Werte der Einzelstoffe und der Mischung so zeigt sich eine intermediäre Toxizität der Mischung, zwischen den Werten der Einzelstoffe mit kleinsten und größten Toxizität. Die Mischung war weniger als die Einzelstoffe EE₂ und Tamoxifen, jedoch toxischer als Verapamil allein (Tabelle 4-43).

Tabelle 4-43: Darstellung der berechneten LC₅₀(48h) der Einzelstoffe und der Mischung.

	EE2	Tamoxifen	Verapamil	Mix
LC ₅₀ (48h), [µmol/L]	5,4	56,8	585,0	190,9

Das Ergebnis widerspricht der Erwartung nach den, in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismen. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte wäre, eine ähnliche Wirkung z.B. über Narkose aller drei Substanzen und damit ein gleicher Wirkmechanismus. Auch wäre eine partielle ähnliche Wirkung von Tamoxifen und 17- α - Ethinylöstradiol denkbar. Nicht auszuschließen ist auch, dass die Schädigung dreier oder mehr unterschiedlicher „Systeme“ im Embryo die Koagulation der Embryonen und damit eine mehr als additive Mischungstoxizität hervorgerufen hat. Schließlich ist auch zu bedenken, dass Wechselwirkungen zwischen den Substanzen (z.B. gegenseitige Beeinflussung des Metabolismus) zu einer Verlängerung der Wirkdauer oder Wirkstärke einer oder mehrerer Substanzen geführt haben kann.

Subletale Effekte

Aufgrund der wenigen beobachteten subletalen Effekte und der fehlenden Konzentrationsabhängigkeit konnten für die Mischung keine Effektkonzentrationen berechnet werden. Vergleicht man jedoch die Häufigkeit der beobachteten subletalen Effekte der Einzelstoffe und der Mischung so zeigten sich bei der Mischung deutlich weniger subletale Effekte (Abbildung 4-15).

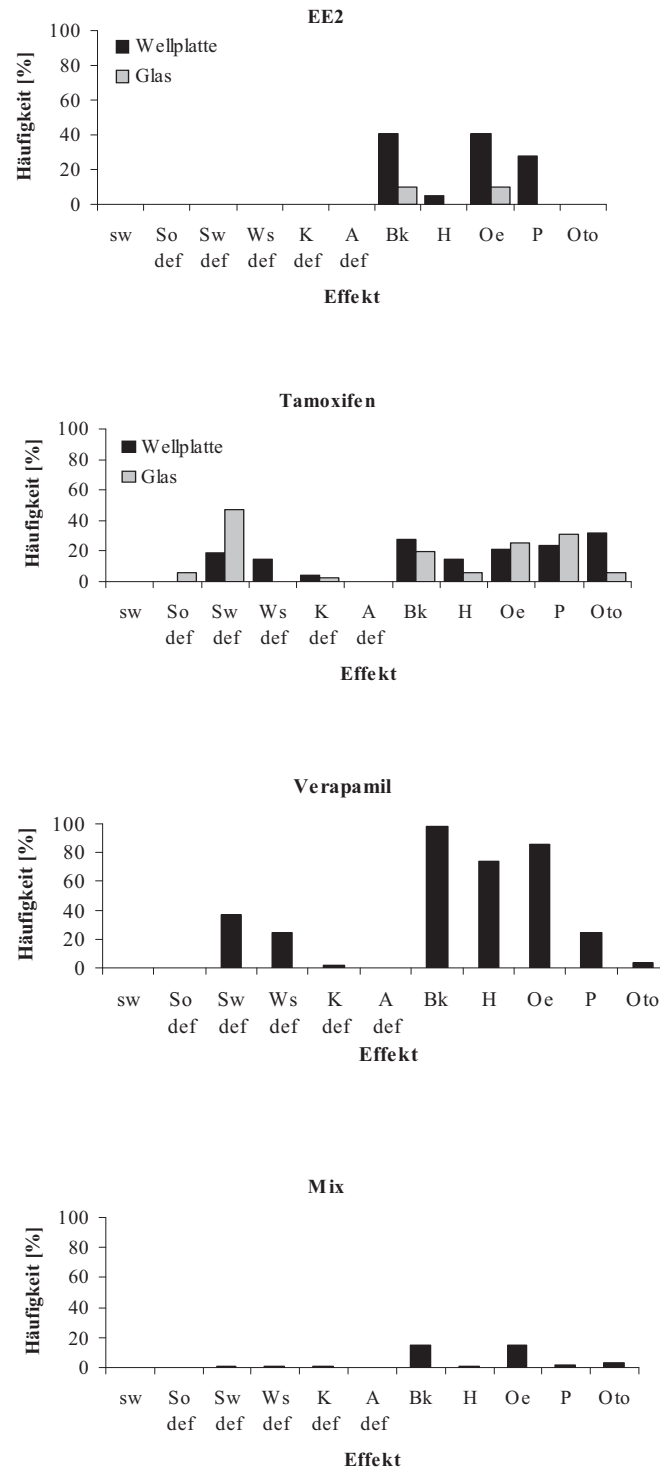


Abbildung 4-15: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Mischung der gemischten Stoffgruppe (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).

4.2 Multiple Mischungen

Es wurden fünf verschiedene multiple Mischungen untersucht. Dabei wurden Mischungen sowohl aus Substanzen mit strikt unähnlichen als auch mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen auf Basis der LC₂₀(48h) und der LC₁₀(48h) getestet. Anschließend wurde eine Mischung auf Basis der NOEC der Einzelstoffe auf ihre Mischungstoxizität hin geprüft.

4.2.1 Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen – beobachtete Effekte

4.2.1.1 Auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe

Es wurde eine Mischung aus Diclofenac, 17- α -Ethinylöstradiol (EE₂), Coffein, Propranolol, Tamoxifen, Carbaryl, Valproinsäure und Verapamil auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe, basierend auf den koagulierten Embryonen untersucht. Es wurden die, in Tabelle 4-44 zusammengestellten Konzentrationen getestet.

Tabelle 4-44: Testkonzentrationen der Mischung der Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe.

Substanz	Konzentration									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diclofenac	0,3	0,6	1,2	2,3	4,6	9,3	18,5	37,1	74,2	148,3
EE2	0,01	0,02	0,04	0,08	0,2	0,3	0,6	1,2	2,4	4,9
Coffein	6,3	12,6	25,2	50,4	100,8	201,5	403,1	806,1	1612,2	3224,4
Propranolol	0,5	1,0	1,9	3,9	7,7	15,5	31,0	62,0	123,9	247,8
Tamoxifen	0,09	0,2	0,4	0,8	1,5	3,0	6,0	12,0	24,0	47,9
Carbaryl	0,06	0,1	0,2	0,5	1,0	1,9	3,8	7,6	15,3	30,5
Valproinsäure	0,2	0,3	0,6	1,3	2,5	5,0	10,0	20,0	40,1	80,1
Verapamil	0,97	1,9	3,9	7,8	15,6	31,1	62,2	124,4	248,9	497,7
Gesamtkonzentration [μ mol/L]	8,4	16,7	33,5	67,1	133,9	267,6	535,2	1070,4	2141,0	4281,6

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende bestimmt. Die gemessenen Werte des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 60 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine letalen und nur bei 2,5 % der eingesetzten Embryonen subletale Effekte beobachtet werden konnten.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 4-45 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab Konzentration 7 (535,2 μ mol/L) konzentrations- und zeitabhängig zu. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 661,5 μ mol/L (r₂: 0,969; b: 11,498; LC₁₀: 433,6 μ mol/L) berechnet.

Tabelle 4-45: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe (1: 8,4 µmol/L; 2: 16,7 µmol/L; 3: 33,5 µmol/L; 4: 67,1 µmol/L; 5: 133,9 µmol/L; 6: 267,6 µmol/L; 7: 535,2 µmol/L; 8: 1070,4 µmol/L; 9: 2141,0 µmol/L; 10: 4281,6 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration											
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14/20
	8	-	-	-	1/20	-	-	-	-	-	6/20	20/20	
	12	-	-	-	1/20	-	-	-	-	-	12/20	20/20	
	24	-	-	-	1/20	-	-	-	-	18/20	2/200	20/20	
	36	-	-	-	1/20	-	-	-	-	18/20	20/20	20/20	
	48	-	-	-	1/20	-	-	-	4/20	20/20	20/20	20/20	
gesamt [%]	48	-	-	-	5	-	-	-	20	100	100	100	

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 4-46 zusammenfassend dargestellt. Nach 8 Stunden zeigte sich ab Konzentration 8 (1070,4 µmol/L) ein verzögerter Gastrulationsbeginn. Auch nach 12 Stunden waren in Konzentration 9 (2141,0 µmol/L) noch alle Embryonen im Stadium der hohen Blastula. Es zeigten sich vereinzelt Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Somiten, Augen und Kopf. Schwanz- und Wirbelsäuledeformationen waren ab Konzentration 5 (133,9 µmol/L) zu beobachten. Effekte auf die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme traten ab Konzentration 2 (16,7 µmol/L) auf. Deutliche Effekte (>10%) auf die Ausbildung der Pigmentierung zeigten sich ab Konzentration 5 (133,9 µmol/L).

Tabelle 4-46: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe (1: 8,4 µmol/L; 2: 16,7 µmol/L; 3: 33,5 µmol/L; 4: 67,1 µmol/L; 5: 133,9 µmol/L; 6: 267,6 µmol/L; 7: 535,2 µmol/L; 8: 1070,4 µmol/L; 9: 2141,0 µmol/L; 10: 4281,6 µmol/L; K: Kontrolle, koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration											
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/20	14/14	koa
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14/14	koa
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa	koa
keine oder deformierte Somitenanlage	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	-	1/20	2/16	koa	koa	koa	
keine oder deformierte Augenanlage	24	-	-	-	-	-	-	-	1/20	2/2	koa	koa	
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa	koa	
deformierter Kopf	24	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa	
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa	koa	
deformierter Schwanz	24	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa	
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	12/20	19/20	16/16	koa	koa	koa	
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	-	-	-	-	2/20	2/2	koa	koa	
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	12/20	19/20	16/16	koa	koa	koa	
kein Herzschlag	36	-	-	-	-	-	-	-	20/20	2/2	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	1/20	10/20	16/16	koa	koa	koa	
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	-	-	20/20	20/20	20/20	2/2	koa	koa	
	48	-	-	1/20	1/19	2/20	20/20	20/20	16/16	koa	koa	koa	
keine Pigmentierung	48	1/40	1/20	-	-	1/20	-	-	-	koa	koa	koa	
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	-	-	12/20	18/20	16/16	koa	koa	koa	
Dotterödem	48	-	-	1/20	1/19	4/20	20/20	20/20	16/16	koa	koa	koa	
Perikardödem	48	-	-	1/20	1/19	4/20	20/20	20/20	16/16	koa	koa	koa	
gesamt	48	-	-	1/20	1/19	4/20	20/20	20/20	16/16	koa	koa	koa	

Wie Abbildung 4-16 zu entnehmen ist, zeigte sich zudem eine Beeinflussung der Herzschlagfrequenz. Ab Konzentration 3 (33,5 $\mu\text{mol/L}$) war eine signifikante Reduktion zu beobachten. Mittels Dunetts Test wurden eine NOEC von 16,7 $\mu\text{mol/L}$ sowie eine LOEC von 33,5 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt.

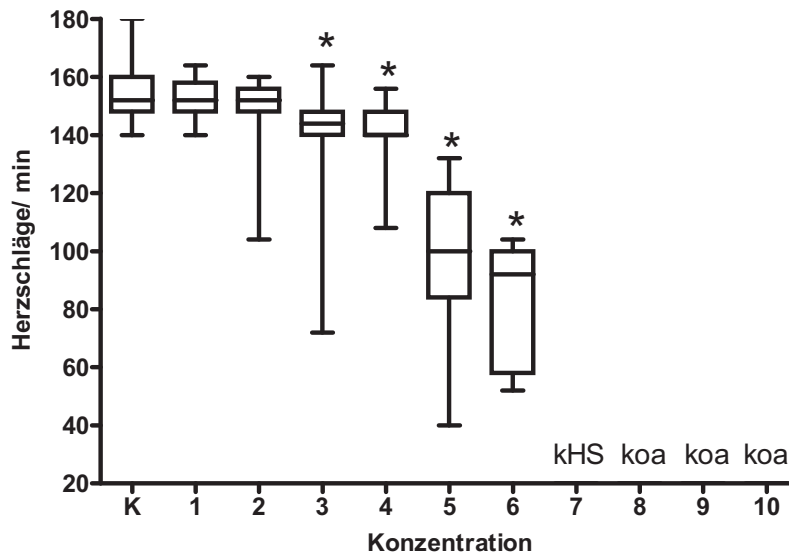


Abbildung 4-16: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der $LC_{20}(48h)$, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; 1: 8,4 $\mu\text{mol/L}$; 2: 16,7 $\mu\text{mol/L}$; 3: 33,5 $\mu\text{mol/L}$; 4: 67,1 $\mu\text{mol/L}$; 5: 133,9 $\mu\text{mol/L}$; 6: 267,6 $\mu\text{mol/L}$; 7: 535,2 $\mu\text{mol/L}$; 8: 1070,4 $\mu\text{mol/L}$; 9: 2141,0 $\mu\text{mol/L}$; 10: 4281,6 $\mu\text{mol/L}$; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 4-47 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-47: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe.

	Zeit[h]	[μmol/L]
LC ₅₀	48	661,5
EC ₅₀ kein Herzschlag	48	265,9
EC ₅₀ kein Blutkreislauf	48	90,5
EC ₅₀ Ödeme	48	84,0
EC ₅₀ Pigmentierung	48	125,3
EC ₅₀ Schwanzdeformation	48	124,8
EC ₅₀ Wirbelsäulendeformation	48	124,8
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	16,7
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	33,5

4.2.1.2 Auf Basis der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe

Die Mischung der Substanzen Diclofenac, EE₂, Coffein, Propranolol, Tamoxifen, Carbaryl, Valproinsäure und Verapamil wurde in diesem Versuch auf Basis der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe basierend auf ausschließlich auf den koagulierten Embryonen untersucht. Die getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 4-48 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-48: Testkonzentrationen der Mischung von Stoffen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe.

Substanz	Konzentration								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diclofenac	0,5	1,0	2,0	3,9	7,9	15,7	31,5	62,9	125,8
EE ₂	0,02	0,04	0,07	0,2	0,3	0,6	1,2	2,3	4,7
Coffein	10,7	21,5	43,0	86,0	171,9	343,8	687,7	1375,3	2750,6
Propranolol	0,8	1,6	3,1	6,3	12,6	25,1	50,3	100,6	201,1
Tamoxifen	0,2	0,3	0,7	1,4	2,7	5,4	10,9	21,7	43,4
Carbaryl	0,1	0,2	0,4	0,8	1,7	3,3	6,7	13,4	26,7
Valproinsäure	0,3	0,6	1,2	2,3	4,7	9,3	18,7	37,3	74,7
Verapamil	1,8	3,6	7,1	14,3	28,6	57,1	114,3	228,6	457,1
Gesamtkonzentration [μmol/L]	14,4	28,8	57,6	115,2	230,4	460,3	921,3	1842,1	3684,1

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende bestimmt. Die gemessenen Werte des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 61 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine letalen und nur bei maximal 6% der eingesetzten Embryonen subletale Effekte beobachtet werden konnten.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 4-49 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab Konzentration 6 (460,3 µmol/L) konzentrations- und zeitabhängig zu. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 596,9 µmol/L (r^2 : 0,923; b: 6,543; LC₁₀: 380,4 µmol/L) berechnet.

Tabelle 4-49: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe(1: 14,4 µmol/L; 2: 28,8 µmol/L; 3: 57,6 µmol/L; 4: 115,2 µmol/L; 5: 230,4 µmol/L; 6: 460,3 µmol/L; 7: 921,3 µmol/L; 8: 1842,1 µmol/L; 9: 3684,1 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration										
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12/20
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/20	20/20
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/20	20/20
	24	-	-	-	-	-	-	-	7/20	20/20	20/20	20/20
	36	-	-	-	-	-	-	-	7/20	20/20	20/20	20/20
	48	-	-	-	2/20	-	-	3/20	20/20	20/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	-	-	10	-	-	15	100	100	100	100

In Tabelle 4-50 sind die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte zusammenfassend dargestellt. In Konzentration 8 (1842,1 µmol/L) waren alle Embryonen sowohl nach 8 als auch nach 12 Stunden noch im Stadium der hohen Blastula. Es zeigten sich zudem Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Somiten, Augen, Kopf, Schwanz und Wirbelsäule. Effekte auf die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und der Pigmentierung sowie Ödeme waren ab Konzentration 3 (57,6 µmol/L) zu beobachten.

Tabelle 4-50: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe (1: 14,4 µmol/L; 2: 28,8 µmol/L; 3: 57,6 µmol/L; 4: 115,2 µmol/L; 5: 230,4 µmol/L; 6: 460,3 µmol/L; 7: 921,3 µmol/L; 8: 1842,1 µmol/L; 9: 3684,1 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration										
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
keine Gastrulation	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16/16	koa
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16/16	koa
keine Schwanzablösung	24	-	-	-	2/20	-	-	1/20	9/13	koa	koa	
	36	-	-	-	2/20	-	-	1/20	9/13	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa	koa	
keine oder deformierte Somitenanlage	24	2/34	1/18	1/20	4/20	1/20	5/20	3/20	6/13	koa	koa	
	36	-	-	-	2/20	-	-	3/20	6/13	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	2/20	-	koa	koa	koa	
keine oder deformierte Augenanlage	24	2/34	1/18	1/20	4/20	1/20	5/20	7/20	13/13	koa	koa	
	36	-	-	-	2/20	-	-	7/20	13/13	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa	koa	
deformierter Kopf	24	-	-	-	2/20	-	-	-	9/13	koa	koa	
	36	-	-	-	2/20	-	-	-	9/13	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa	koa	
deformierter Schwanz	24	2/34	1/18	1/2	4/20	1/20	5/20	3/20	13/13	koa	koa	
	36	-	-	-	2/20	-	-	3/20	13/13	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	20/20	17/17	koa	koa	koa	
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	-	2/20	-	-	-	6/13	koa	koa	
	36	-	-	-	2/20	-	-	-	6/13	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	20/20	17/17	Koa	koa	koa	
kein Herzschlag	36	-	-	-	2/20	-	20/20	20/20	13/13	koa	koa	
	48	-	-	-	-	-	5/20	16/17	koa	koa	koa	
kein Blutkreislauf	36	-	-	-	2/20	7/20	20/20	20/20	13/13	koa	koa	
	48	-	-	-	1/18	4/20	20/20	17/17	koa	koa	koa	
keine Pigmentierung	48	2/34	-	-	1/18	-	-	1/17	koa	koa	koa	
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	1/18	-	20/20	16/17	koa	koa	koa	
Dotterödem	48	-	-	-	1/18	7/20	20/20	17/17	koa	koa	koa	
Perikardödem	48	-	-	-	1/18	7/20	20/20	17/17	koa	koa	koa	
gesamt	48	-	-	-	1/18	7/20	20/20	17/17	koa	koa	koa	

Wie Abbildung 4-17 zu entnehmen ist, zeigte sich zudem eine Beeinflussung der Herzschlagfrequenz. Ab Konzentration 3 (57,6 µmol/L) war eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz zu beobachten. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 28,8 µmol/L sowie eine LOEC von 57,6 µmol/L ermittelt.

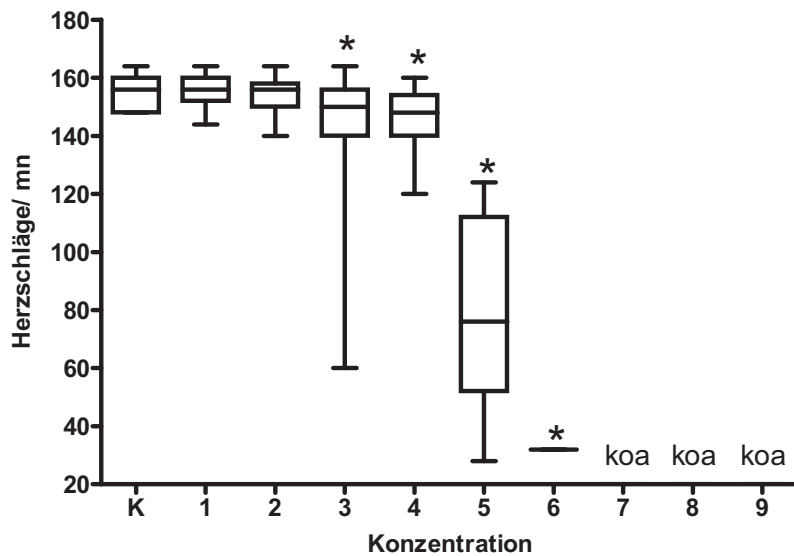


Abbildung 4-17: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der $LC_{10}(48h)$, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; 1: 14,4 $\mu\text{mol/L}$; 2: 28,8 $\mu\text{mol/L}$; 3: 57,6 $\mu\text{mol/L}$; 4: 115,2 $\mu\text{mol/L}$; 5: 230,4 $\mu\text{mol/L}$; 6: 460,3 $\mu\text{mol/L}$; 7: 921,3 $\mu\text{mol/L}$; 8: 1842,1 $\mu\text{mol/L}$; 9: 3684,1 $\mu\text{mol/L}$; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

Die anhand der beobachteten Effekte berechneten LC_{50} , EC_{50} sowie NOEC und LOEC sind in Tabelle 4-51 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-51: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen auf Basis der $LC_{10}(48h)$ der Einzelstoffe.

	Zeit[h]	[$\mu\text{mol/L}$]
LC_{50}	48	596,9
EC_{50} kein Herzschlag	48	283,8
EC_{50} kein Blutkreislauf	48	66,9
EC_{50} Ödeme	48	128,3
EC_{50} Pigmentierung	48	162,9
EC_{50} Schwanzdeformation	48	192,9
EC_{50} Wirbelsäulendeformation	48	162,9
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	28,8
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	57,6

4.2.2 Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen – beobachtete Effekte

4.2.2.1 Auf Basis der LC₂₀(48h)

Es wurde eine Mischung, der in Tabelle 4-52 dargestellten Substanzen auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen untersucht.

Tabelle 4-52: Testkonzentrationen der Mischung von Stoffen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe.

Substanz	Konzentration				
	1	2	3	4	5
ASS	61,3	91,9	137,9	206,8	310,2
Diclofenac	29,3	43,9	65,9	98,9	148,3
Ibuprofen	29,4	44,1	66,1	99,1	148,7
Naproxen	39,1	58,6	87,9	131,8	197,7
Paracetamol	1510,5	2265,7	3398,6	5097,9	7646,8
EE ₂	0,97	1,5	2,2	3,3	4,9
Coffein	636,9	955,4	1433,1	2149,6	3224,4
Malathion	4,2	6,3	9,4	14,1	21,1
Parathion	5,4	8,0	12,0	18,1	27,1
Propranolol	49,0	73,4	110,1	165,2	247,8
Tamoxifen	9,5	14,2	21,3	32,0	47,9
Carbaryl	6,0	9,0	13,6	20,4	30,5
Valproinsäure	15,8	23,7	35,6	53,4	80,1
Verapamil	98,3	147,5	221,2	331,8	497,7
Gesamtkonzentration [µmol/L]	2495,7	3743,2	5614,9	8422,4	12633,2

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden vor Testbeginn bestimmt. Die gemessenen Werte für Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. In Konzentration 5 lag zu Versuchsbeginn der pH-Wert unter 5, so dass eine Beeinträchtigung der Embryonen durch den geringen pH nicht ausgeschlossen werden kann. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 62 zusammengestellt. Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden weder letalen noch subletale Effekte beobachtet werden konnten.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 4-53 zusammengefasst. Bis in die niedrigste untersuchte Konzentration koagulierten zeitabhängig alle Embryonen. Die Angabe einer LC₅₀(48h) ist daher nicht möglich.

Tabelle 4-53: Zusammenstellung der letalen Effekte Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe (1: 2495,7 µmol/L; 2: 3743,2 µmol/L; 3: 5614,9 µmol/L; 4: 8422,4 µmol/L; 5: 12633,2 µmol/L; K. Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration					
		K	1	2	3	4	5
Koagulation	4	-	-	-	1/20	18/20	20/20
	8	-	12/20	18/20	20/20	20/20	20/20
	12	-	12/20	18/20	20/20	20/20	20/20
	24	-	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	36	-	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	48	-	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	100	100	100	100	100

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 4-54 zusammenfassend dargestellt. In Konzentration 1 (2495,7 µmol/L) und Konzentration 5 (12633,2 µmol/L) konnten keine subletalen Effekte beobachtet werden. In diesen beiden Konzentrationen koagulierten alle eingesetzten Embryonen innerhalb von 24 bzw. 4 Stunden. In den übrigen drei Konzentrationen zeigten nach 4 Stunden 15% bzw. 100% der Embryonen Deformationen an der hohen Blastula. In Konzentration 2 (3743,2 µmol/L) waren nach 8 bzw. 12 Stunden die einzigen beiden nicht-koagulierten Embryonen noch im Stadium der hohen Blastula.

Tabelle 4-54: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe (1: 2495,7 µmol/L; 2: 3743,2 µmol/L; 3: 5614,9 µmol/L; 4: 8422,4 µmol/L; 5: 12633,2 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration					
		K	1	2	3	4	5
deformierte hohe Blastula	4	-	-	3/20	19/19	2/2	koa
keine Gastrulation	8	-	-	2/2	koa	koa	koa
	12	-	-	2/2	koa	koa	koa
Schlupf	48	4/20	koa	koa	koa	koa	koa

Aufgrund der Koagulation aller exponierten Embryonen konnte nur die Herzschlagfrequenz der Kontrolle ermittelt werden. Es ergab sich ein Mittelwert von 162,4 Schlägen pro Minute (95% Vertrauensintervall: 160,5 – 164,3 Schläge/min; SD¹: 3,979). Eine Angabe von NOEC und LOEC ist daher nicht möglich.

¹ SD: Standardabweichung

4.2.2.2 Auf Basis der LC₁₀(48h)

Die Mischung der Substanzen Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Paracetamol, 17- α -Ethinylöstradiol (EE₂), Coffein, Malathion, Parathion, Propranolol, Tamoxifen, Carbaryl, Valproinsäure und Verapamil wurde in diesem Ansatz auf Basis der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe basierend auf den koagulierten Embryonen untersucht. Die getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 4-55 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4-55: Testkonzentrationen der Mischung von Stoffen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe.

Substanz	Konzentration									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ASS	0,6	1,2	2,3	4,6	9,2	18,3	36,6	73,3	146,6	293,1
Diclofenac	0,3	0,5	1,0	2,0	4,0	7,9	15,7	31,5	62,9	125,8
Ibuprofen	0,3	0,5	1,0	2,0	4,0	7,9	15,9	31,8	63,6	127,1
Naproxen	0,4	0,7	1,4	2,8	5,6	11,2	22,5	44,9	89,9	179,7
Paracetamol	11,8	23,5	47,0	94,0	188,0	376,0	751,9	1503,8	3007,7	6015,3
EE ₂	0,01	0,02	0,04	0,07	0,2	0,3	0,6	1,2	2,3	4,7
Coffein	5,4	10,7	21,5	43,0	86,0	171,9	343,8	687,7	1375,3	2750,6
Malathion	0,04	0,1	0,2	0,3	0,6	1,2	2,4	4,8	9,6	19,1
Parathion	0,1	0,2	0,2	0,4	0,8	1,5	3,1	6,2	12,3	24,6
Propranolol	0,4	0,8	1,6	3,1	6,3	12,6	25,1	50,3	100,6	201,1
Tamoxifen	0,1	0,2	0,3	0,7	1,4	2,7	5,4	10,9	21,7	43,4
Carbaryl	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,7	3,4	6,7	13,4	26,7
Valproinsäure	0,2	0,3	0,6	1,2	2,3	4,7	9,4	18,7	37,3	74,7
Verapamil	0,9	1,8	3,6	7,1	14,3	28,6	57,1	114,3	228,6	457,1
Gesamtkonzentration [μ mol/L]	20,6	40,6	80,9	161,7	323,5	646,5	1292,9	2586,1	5171,8	10343

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden vor Testbeginn bestimmt. Die gemessenen Werte für Sauerstoffsättigung und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. In Konzentration 10 (10343 μ mol/L) lag zu Versuchsbeginn der pH-Wert unter 5, so dass eine Beeinträchtigung der Embryonen durch den geringen pH nicht ausgeschlossen werden kann. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 63 zusammengestellt.

Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden jeweils nur bei 3% letale bzw. subletale Effekte beobachtet werden konnten.

Die Anzahl der koagulierten Embryonen ist in Tabelle 4-56 zusammengefasst. Die letalen Effekte nahmen ab Konzentration 6 (646,5 μ mol/L) konzentrations- und zeitabhängig zu. Es wurde eine LC₅₀(48h) von 829,5 μ mol/L (r₂: 0,954; b: 7,338; LC₁₀: 459,3 μ mol/L) berechnet.

Tabelle 4-56: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe (1:20,6 µmol/L; 2: 40,6 µmol/L; 3: 80,9 µmol/L; 4: 161,7 µmol/L; 5: 323,5 µmol/L; 6: 646,5 µmol/L; 7: 1292,9 µmol/L; 8: 2586,1 µmol/L; 9: 5171,8 µmol/L; 9: 5171,8 µmol/L; 10: 10343 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration											
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Koagulation	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19/20	20/20
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	4/20	20/20	20/20	20/20
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	4/20	20/20	20/20	20/20
	24	1/37	-	2/19	2/19	-	-	1/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	36	1/37	-	2/19	2/19	-	-	1/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	48	1/37	-	2/19	2/19	-	-	5/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	2,7	-	10,5	10,5	-	-	25	100	100	100	100	

Die während der 48-stündigen Exposition beobachteten subletalen Effekte sind in Tabelle 4-57 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich vereinzelt Effekte auf die Schwanzablösung vom Dotter sowie Deformationen an Somiten, Augen und Kopf. Schwanz- und Wirbelsäulendeformationen nahmen nach 48 Stunden ab Konzentration 3 (80,9 µmol/L) konzentrationsabhängig zu. Effekte auf die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems und Ödeme waren ab der niedrigsten untersuchten Konzentration zu beobachten. Deutliche Effekte (>10%) auf die Ausbildung der Pigmentierung traten ab Konzentration 4 (161,7µmol/L) auf.

Tabelle 4-57: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe (1:20,6 µmol/L; 2: 40,6 µmol/L; 3: 80,9 µmol/L; 4: 161,7 µmol/L; 5: 323,5 µmol/L; 6: 646,5 µmol/L; 7: 1292,9 µmol/L; 8: 2586,1 µmol/L; 9: 5171,8 µmol/L; 9: 5171,8 µmol/L; 10: 10343 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	Konzentration										
		K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
keine Schwanzablösung	24	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	36	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
keine oder deformierte Somitenanlage	24	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	36	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	-	1/17	2/20	2/20	6/15	koa	koa	koa	koa
keine oder deformierte Augenanlage	24	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	36	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
deformierter Kopf	24	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	36	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
deformierter Schwanz	24	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	36	-	-	1/17	-	-	-	1/19	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	-	1/17	9/20	17/20	14/15	koa	koa	koa	koa
deformierte Wirbelsäule	24	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	36	-	-	1/17	-	-	-	-	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	-	1/17	9/20	16/20	14/15	koa	koa	koa	koa
kein Herzschlag	36	-	-	1/17	-	-	2/20	19/19	koa	koa	koa	koa
	48	-	-	-	-	-	2/20	15/15	koa	koa	koa	koa
kein Blutkreislauf	36	-	-	1/17	9/17	18/20	20/20	19/19	koa	koa	koa	koa
	48	-	1/20	-	4/17	13/20	20/20	15/15	koa	koa	koa	koa
keine Pigmentierung	48	-	1/20	-	-	1/20	-	-	koa	koa	koa	koa
reduzierte Pigmentierung	48	-	-	-	1/17	5/20	9/20	15/15	koa	koa	koa	koa
Dotterödem	48	1/36	1/20	1/17	9/17	18/20	20/20	15/15	koa	koa	koa	koa
Perikardödem	48	1/36	1/20	1/17	9/17	18/20	20/20	15/15	koa	koa	koa	koa
gesamt	48	1/36	1/20	1/17	9/17	18/20	20/20	15/15	koa	koa	koa	koa

Wie Abbildung 4-18 zu entnehmen ist, zeigte sich außerdem eine Beeinflussung der Herzschlagfrequenz. Ab Konzentration 3 (80,9 µmol/L) konnte eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz beobachtet werden. Mittels Dunetts-Test wurden eine NOEC von 40,6 µmol/L sowie eine LOEC von 80,9 µmol/L ermittelt.

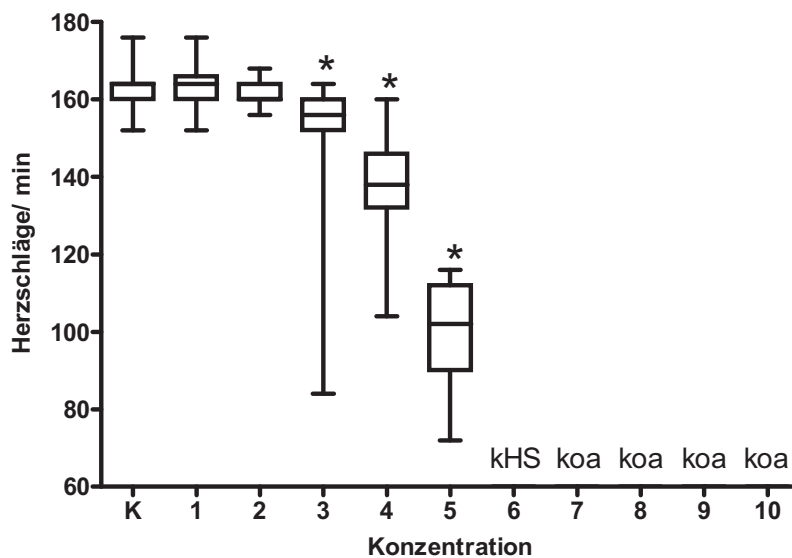


Abbildung 4-18: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Substanzen mit gleichen wie auch verschiedenen Wirkmechanismen basierend auf der $LC_{10}(48h)$, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; 1:20,6 $\mu\text{mol/L}$; 2: 40,6 $\mu\text{mol/L}$; 3: 80,9 $\mu\text{mol/L}$; 4: 161,7 $\mu\text{mol/L}$; 5: 323,5 $\mu\text{mol/L}$; 6: 646,5 $\mu\text{mol/L}$; 7: 1292,9 $\mu\text{mol/L}$; 8: 2586,1 $\mu\text{mol/L}$; 9: 5171,8 $\mu\text{mol/L}$; 10: 10343 $\mu\text{mol/L}$; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).

4.2.3 Multiple Mischungen - zusammenfassende Betrachtung

Es wurden zwei Mischungen aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen einmal auf Basis der $LC_{10}(48h)$ und einmal auf Basis der $LC_{20}(48h)$ der Einzelstoffe untersucht. Es wurden Carbaryl, Coffein, Diclofenac, EE_2 , Propranolol, Tamoxifen sowie Valproinsäure und Verapamil eingesetzt.

Ebenso wurden zwei Mischungen aus Substanzen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen untersucht. Dafür wurden ASS, Carbaryl, Coffein, Diclofenac, EE_2 , Ibuprofen, Malathion, Naproxen, Paracetamol, Parathion, Propranolol, Tamoxifen sowie Valproinsäure und Verapamil eingesetzt.

Die Annahmen ähnlicher und unähnlicher Wirkmechanismen gründen auf Literaturdaten für den Säuger. Ob die beschriebenen Mechanismen auch für den Fisch bzw. den Fischembryo zutreffen ist unklar. Trotzdem wurde aufgrund der Literaturdaten für alle vier untersuchten Mischungen eine weniger als additive Mischungstoxizität erwartet.

Letale Effekte

Eine Vorhersage nach dem Konzept der *Unabhängigen Wirkung* konnte für alle vier Mischungen aufgrund der steilen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe nur für die höchste untersuchte Konzentration erfolgen. Die beobachteten letalen Effekte und die Vorhersagen sind in Tabelle 4-58 zusammengestellt. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, unterschätzte das Konzept die Toxizität aller vier untersuchten Mischungen.

Tabelle 4-58: Darstellung der beobachteten und nach dem Konzept der *Unabhängigen Wirkung* erwarteten letalen Effekte der höchsten untersuchten Konzentration (ähnl WM: Mischung aus Substanzen mit partielle ähnlichen Wirkmechanismen; unähnl WM: Mischung aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen).

Mix	Mischung			
	unähnl WM LC ₂₀	unähnl WM LC ₁₀	ähnl WM LC ₂₀	ähnl WM LC ₁₀
<i>beobachtet</i>	100%	100%	100%	100%
<i>Vorhersage IA</i>	83,2%	60 %	96%	77 %

In Abbildung 4-19, Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21 sind die beobachtete Mortalität (schwarz) von drei der vier untersuchten Mischungen und die Vorhersagen nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (rot) zusammenfassend dargestellt. Für die Mischung aus Substanzen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe kann keine Darstellung erfolgen, da bis in die niedrigste untersuchte Konzentration alle eingesetzten Embryonen koagulierten.

Wie den Abbildungen zu entnehmen ist, zeigte sich, entgegen der Erwartungen, in allen drei Versuchen eine additive Mischungstoxizität.

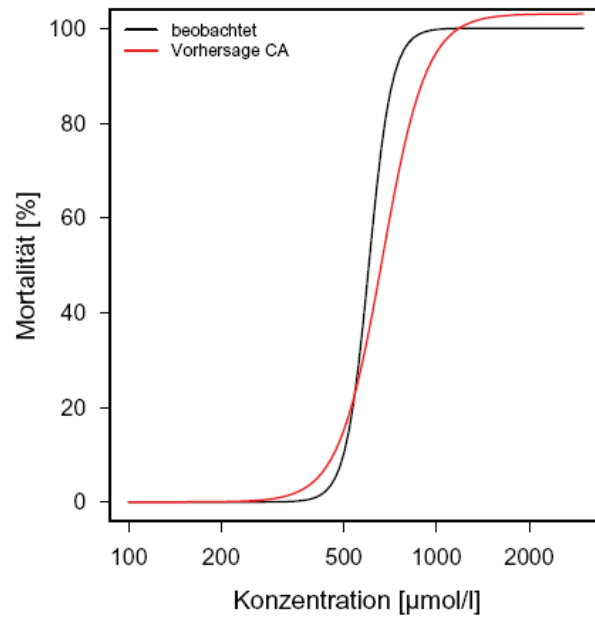


Abbildung 4-19: Vergleich der beobachteten Mortalität der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der $LC_{20}(48h)$ der Einzelstoffe (schwarz) mit der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA, rot).

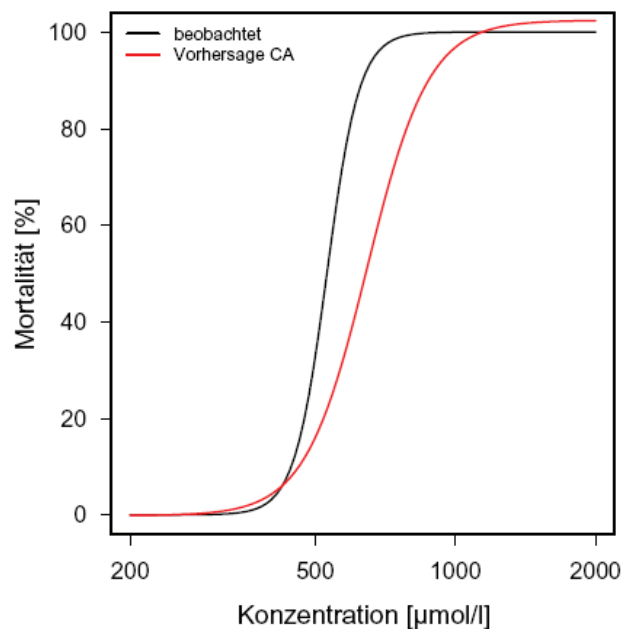


Abbildung 4-20: Vergleich der beobachteten Mortalität der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der $LC_{10}(48h)$ der Einzelstoffe (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA; rot).

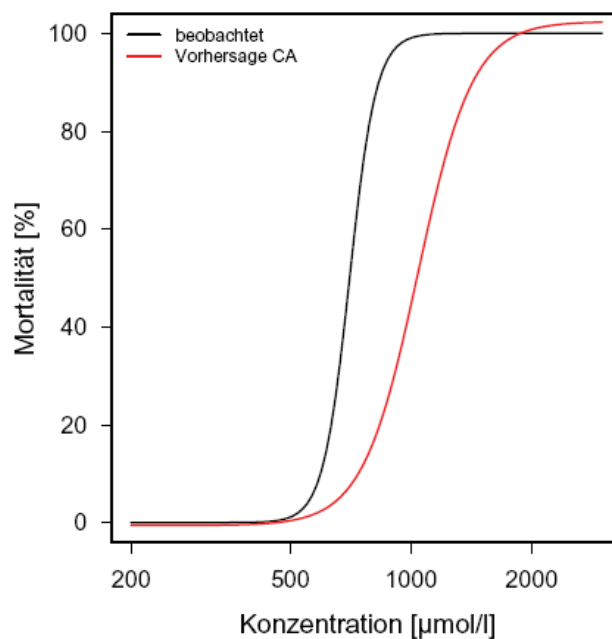


Abbildung 4-21: Vergleich der beobachteten Mortalität der Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der $LC_{10}(48h)$ der Einzelstoffe (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA, rot).

In Tabelle 4-59 sind die, anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten und die nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagten LC_{50} -Werte für alle drei Versuche zusammengestellt. Wie anhand der Abbildungen zu erwarten war, lagen die berechneten LC_{50} -Werte der einzelnen Mischungen im Bereich der nach CA vorhergesagten Werte. Zudem gab es bei den beiden Mischungen aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen eine Überschneidung bei den 95% Vertrauensintervallen. Außerdem waren die Unterschiede zwischen Beobachtung und Vorhersage, wie auch bei der Mischung aus Substanzen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen, gering (<2), so dass das Konzept der *Konzentrationsadditivität* die Toxizität aller drei Mischungen gut vorhergesagt hat.

Tabelle 4-59: Darstellung der anhand der beobachteten Effekte berechneten und der nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagten $LC_{50}(48h)$ -Werte (95% Vertrauensintervall) sowie der „Spacing“-Faktoren zwischen Vorhersage und Beobachtung (ähnl WM: Mischung aus Substanzen mit partielle ähnlichen Wirkmechanismen; unähnl WM: Mischung aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen).

Test	$LC_{50}(48h)$, [µmol/L]	$LC_{50}(48h)$, [µmol/L]	Faktor
	<i>beobachtet</i>	<i>Vorhersage CA</i>	
unähnl WM LC_{20}	661,5 (601,4 – 731,1)	672,5 (663,4 – 682,0)	1,01
unähnl WM LC_{10}	596,9 (529,8 – 671,3)	652,0 (649,0 – 654,9)	1,1
ähnl WM LC_{10}	795,9 (688,5 – 915,0)	1052,7 (1047,4 – 1058,1)	1,3

Vergleicht man die ermittelten LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischungen, so zeigt sich eine intermediäre Toxizität der Mischungen zwischen den Werten der Einzelstoffe mit der größten und kleinsten Toxizität (Tabelle 4-60, Tabelle 4-61).

Tabelle 4-60: Darstellung der berechneten LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischungen (unähnl WM: Mischung aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen).

	LC ₅₀ (48h), [µmol/L]
Carbaryl	39,4
Coffein	4362,7
Diclofenac	192,6
EE ₂	5,4
Propranolol	368,1
Tamoxifen	56,8
Valproinsäure	585
Verapamil	91,5
Mix unähnl WM LC ₂₀	661,5
Mix unähnl WM LC ₁₀	596,9

Tabelle 4-61: Darstellung der berechneten LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischungen (ähnl WM: Mischung aus Substanzen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen).

	LC ₅₀ (48h), [µmol/L]
ASS	345,5
Carbaryl	39,4
Coffein	4362,7
Diclofenac	192,6
EE ₂	5,4
Ibuprofen	200,5
Malathion	25,5
Naproxen	237,1
Paracetamol	12071,6
Parathion	32,5
Propranolol	368,1
Tamoxifen	56,8
Verapamil	585
Valproinsäure	91,5
Mix ähnl WM LC ₂₀	< 12633,2
Mix unähnl WM LC ₁₀	795,9

Die Ergebnisse aller vier Versuche widersprechen den Erwartungen nach den, in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismen. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte wären auch hier ähnliche Wirkmechanismen der untersuchten Substanzen z.B. über Narkose. Auch wäre eine Schädigung vieler unterschiedlicher „Systeme“ im Embryo denkbar, wodurch die Koagulation der Embryonen und damit die additive Mischungstoxizität hervorgerufen wurde. Zudem sind Wechselwirkungen zwischen den Substanzen (z.B. gegenseitige

Beeinflussung des Metabolismus) nicht auszuschließen, was zu einer Verlängerung der Wirkdauer oder Wirkstärke einer oder mehrerer Substanzen führen kann. Ebenfalls sind additive Effekte der Substanzen mit gleichen Wirkmechanismen denkbar. Durch Metabolisierung kann außerdem die Anzahl der wirksamen Substanzen erhöht worden sein.

Die Annahme ähnlicher und unähnlicher Wirkmechanismen basiert zudem auf Literaturdaten von Säugern. Es ist nicht geklärt, ob die Substanzen auch im Fisch einen entsprechenden Wirkmechanismus zeigen, auch wenn ihre target-Moleküle in Fischen nachgewiesen worden sind. Unklar ist zudem auch ab welchem Entwicklungsstadium die target-Moleküle ausgebildet werden.

Subletale Effekte

Betrachtet man die subletalen Effekte, so zeigten sich zum einen ähnliche Effekte wie bei den Einzelstoffen (3.1); zum anderen aber auch ähnliche Effekte der einzelnen Mischungen, wie Abbildung 4-22 und Tabelle 4-62 zu entnehmen ist.

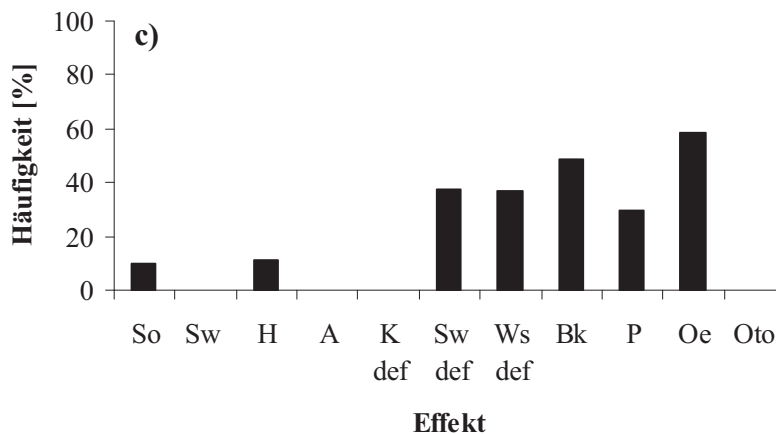
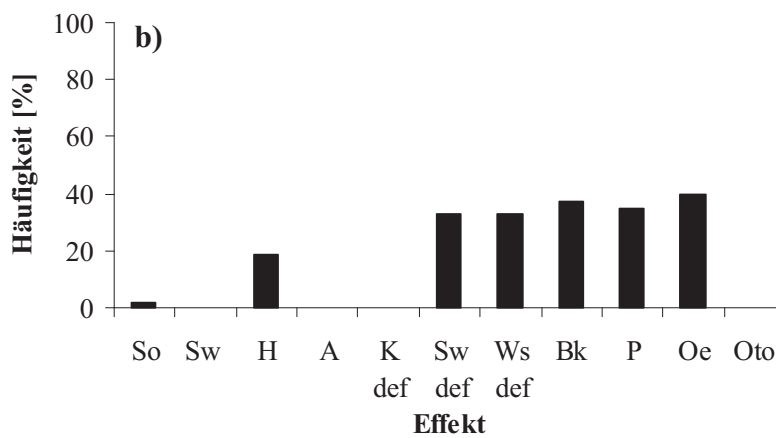
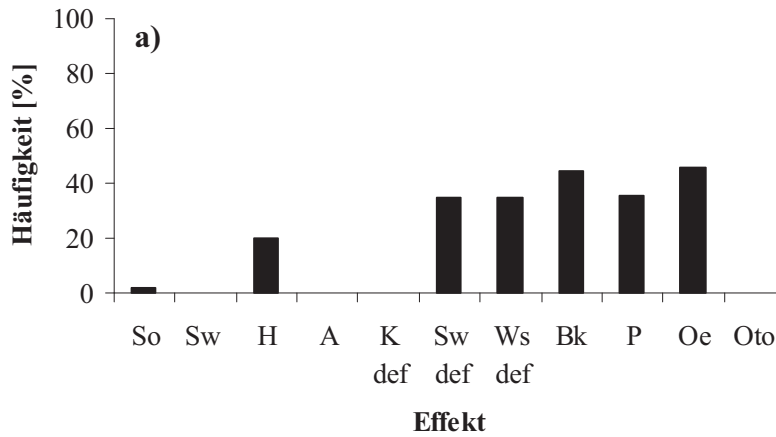


Abbildung 4-22: Vergleich der beobachteten subletalen Effekte der multiplen Mischungen nach 48 Stunden: a) auf Basis der $LC_{20}(48h)$ mit Substanzen strikt unähnlicher Wirkmechanismen; b) auf Basis der $LC_{10}(48h)$ mit Substanzen strikt unähnlicher Wirkmechanismen; c) auf Basis der $LC_{10}(48h)$ mit Substanzen partiell ähnlicher Wirkmechanismen (So: Somitendeformation; Sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; H: kein Herzschlag; A : Augendeformation; K def: Kopfdeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oe: Ödeme; Oto: keine oder deformierte Otolithen)

Tabelle 4-62: Berechnete Effektkonzentrationen für die untersuchten multiplen Mischungen (ähnl WM: Mischung aus Substanzen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen; unähnl WM: Mischung aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen).

	Zeit [h]	Mix unähnl WM LC ₂₀	Mix unähnl WM LC ₁₀	Mix ähnl WM LC ₁₀
EC ₅₀ kein Herzschlag	48	265,9	283,8	430,9
EC ₅₀ kein Blutkreislauf	48	90,5	66,9	125,6
EC ₅₀ Ödeme	48	84,0	128,3	81,5
EC ₅₀ Pigmentierung	48	125,3	162,9	280,5
EC ₅₀ Schwanzdeformation	48	124,8	192,9	184,5
EC ₅₀ Wirbelsäulendeformation	48	124,8	162,9	184,5
NOEC (Herzschlagfrequenz)	48	16,7	28,8	40,6
LOEC (Herzschlagfrequenz)	48	33,5	57,6	80,9

Vergleicht man die ermittelten Effektkonzentrationen der Einzelstoffe (3.1) und der Mischungen, so zeigt sich, ähnlich wie bei den letalen Effekten, eine intermediäre Toxizität der Mischungen zwischen den Extrema der Einzelstoffe. Auf eine ausführliche Darstellung wurde hier verzichtet.

4.2.4 Mischungen auf Basis der NOEC

Um zu untersuchen, ob eine Kombination niedriger Einzelstoff-Konzentrationen, die allein appliziert, mehr oder weniger keinen Effekt hervorrufen, einen Mischungseffekt hervorrufen kann, wurden drei verschiedene NOEC-Ansätze getestet. Die einzelnen Mischungskomponenten sowie die getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 4-63 zusammenfassend dargestellt. In der NOEC 1 und NOEC 2 wurden Stoffe sowohl ähnlicher als auch unähnlicher Wirkmechanismen mit einer NOEC von bis zu 1g/L eingesetzt. In NOEC 2 wurden auch die Substanzen berücksichtigt, bei denen die Untersuchung nur bis zur Löslichkeitsgrenze möglich war. In NOEC 3 wurden Stoffe mit unähnlichen Wirkmechanismen untersucht.

Tabelle 4-63: Zusammensetzung der drei untersuchten Ansätze auf Basis der NOEC der Einzelstoffe (+: in der Mischung enthalten).

Substanz	NOEC 1	NOEC 2	NOEC 3	Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]
Bezafibrat		+	+	276,4
Carbamazepin	+	+	+	211,6
Carbaryl	+	+	+	16,3
Clarithromycin		+		13,4
Clenbuterol	+	+	+	478,2
Clofibrinsäure		+		131,1 / 2796,0
Coffein	+	+	+	412,0
Cyclophosphamid	+	+	+	3583,0
Diclofenac	+	+		2,8
EE2	+	+	+	1,9
Erythromycin		+		13,6
Fenofibrat		+		207,9
Ibuprofen	+	+		35,6
Naproxen	+	+	+	107,4
Paracetamol	+	+		2513,2
Propranolol	+	+	+	125
Roxithromycin		+	+	12,0
Sulfamethoxazol	+	+	+	1579,1
Theophyllin	+	+	+	1429,4
Verapamil	+	+		100,0

Es wurden für alle drei Ansätze zwei Tests durchgeführt. In einem Test wurde der pH-Wert der Lösung nicht eingestellt und Clofibrinsäure in der Konzentration 131,1 $\mu\text{mol/L}$ untersucht. In einem zweiten Test wurde der pH-Wert der Lösungen mit 0,1N NaOH auf 7 eingestellt und Clofibrinsäure in einer Konzentration von 2796 $\mu\text{mol/L}$ untersucht.

Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH- Wert wurden sowohl vor Testbeginn als auch nach Testende bestimmt. Die gemessenen Werte für Sauerstoffe und Leitfähigkeit des Kontrollmediums sowie der Testlösungen lagen in dem für den Test zulässigen Bereich. In den drei getesteten Mischungen, in denen der pH der Testlösungen nicht eingestellt worden war, lag der pH-Wert unter 5, dass eine Beeinflussung der Embryonen durch den geringen pH nicht ausgeschlossen werden kann. Die Werte sind im Anhang C in Tabelle 64 zusammengestellt. Der Test ist valide, da an den Kontrollembryonen nach 48 Stunden keine Effekte zu beobachten waren.

Wie Tabelle 4-64 zu entnehmen ist, koagulierten in allen drei untersuchten Ansätzen die exponierten Embryonen innerhalb von 12 Stunden, unabhängig davon, ob der pH der Lösungen eingestellt worden war.

Tabelle 4-64: Zusammenstellung der letalen Effekte der NOEC-Ansätze (K: Kontrolle; m. pH: mit Einstellung des pH-Wertes; o. pH: ohne Einstellung des pH-Wertes; -: Effekt nicht beobachtet).

Effekt	Zeit [h]	K	NOEC 1		NOEC 2		NOEC 3	
			m. pH	o. pH	m. pH	o.pH	m. pH	o. pH
Koagulation	4	-	-	20/20	-	20/20	-	20/20
	8	-	19/20	20/20	17/20	20/20	13/20	20/20
	12	-	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	24	-	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	36	-	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	48	-	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
gesamt [%]	48	-	100	100	100	100	100	100

Es konnten aufgrund der letalen keine subletalen Effekte beobachtet werden. Ebenso konnte nur für die Kontrollembryonen die Herzschlagfrequenz bestimmt werden. Die mittlere Herzschlagfrequenz der Kontrollen lag bei 168 Schlägen pro Minute (95% Vertrauensintervall: 165-171 Schläge/min; SD²: 7,032).

In Tabelle 4-65 sind die aus der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Einzelstoffe berechneten Effekte der NOEC sowie die, in dieser Konzentration tatsächlich beobachteten Effekte vergleichend dargestellt. Ebenfalls aus der Tabelle ersichtlich sind die Konsequenzen, die sich daraus für die Vorhersagen nach dem Konzept der *Unabhängigen Wirkung* ergeben.

² SD: Standardabweichung

Tabelle 4-65: Vergleich der beobachteten und berechneten Effekte für die NOEC-Konzentrationen der Einzelstoffe sowie die Vorhersagen nach dem Konzept der *Unabhängigen Wirkung*.

Substanz	Einzelstoffeffekt [%] <i>berechnet</i>	Einzelstoffeffekt [%] <i>beobachtet</i>
Bezafibrat	<1	10
Carbamazepin	<1	10
Carbaryl	<1	10
Clarithromycin	<1	25
Clenbuterol	<1	<1
Clofibrinsäure	<1	30
Coffein	<1	<1
Cyclophosphamid	<1	15
Diclofenac	<1	20
EE2	<1	15
Erythromycin	<1	11
Fenofibrat	<1	25
Ibuprofen	<1	10
Naproxen	<1	20
Paracetamol	<1	10
Propranolol	1,1	15
Roxithromycin	<1	5
Sulfamethoxazol	<1	35
Theophyllin	<1	5
Verapamil	<1	<1
NOEC 1 / Vorhersage IA	12,3	80,7
NOEC 2 / Vorhersage IA	18,3	95,4
NOEC 3 / Vorhersage IA	11,5	79,4

Es zeigte sich in allen drei Ansätzen ein deutlicher Kombinationseffekt, obwohl die eingesetzten Konzentrationen alleine keinen (auf Basis der berechneten Einzelstoffeffekte) oder einen geringen Effekt (auf Basis der beobachteten Einzelstoffeffekte) hervorrufen würden. Diese Ergebnisse werden durch Arbeiten von Broderius et al. (2005), Cleuvers (2004), Silva et al. (2002) und Walter et al. (2002) bestätigt. Auch in ihren Studien an Fischen, Algen und Hefen zeigten sich deutliche Effekte der Mischung, obwohl die eingesetzten Konzentrationen der Einzelstoffe allein appliziert keinen Effekt hervorgerufen hätten.

Ebenso lässt sich feststellen, dass das Konzept der *Unabhängigen Wirkung* den Gesamteffekt der Mischung unterschätzt, unabhängig davon, ob die berechneten oder beobachteten Einzelstoffeffekte für die Berechnung berücksichtigt wurden und auch unabhängig davon, ob die Substanzen partiell ähnliche oder strikt unähnliche Wirkmechanismen aufwiesen.

Zumindest für die NOEC-Mischung aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den Resultaten von Walter et al. (2002). Sie konnten zeigen, dass die Mischungstoxizität basierend auf der NOEC von Substanzen unähnlicher Struktur (und damit möglicherweise unähnlicher Wirkung) im Algentest sehr gut anhand des Konzeptes der *Unabhängigen Wirkung* vorhergesagt werden kann. Das vorliegende Ergebnis

wird jedoch durch Studien von Hermens et al. (1984b) und Hermens und Leeuwangh (1982) in Daphnien gestützt, in denen die Toxizität von Mischungen aus Substanzen mit verschiedener Struktur und damit (möglicherweise) verschiedenen Wirkmechanismen anhand des Konzepts der *Konzentrationsadditivität* beschrieben werden konnte.

Andererseits kann für alle untersuchten Substanzen keine eindeutig Aussage über ihren Wirkmechanismus im untersuchten Organismus getroffen werden. Die Annahmen ähnlicher bzw. unähnlicher Wirkmechanismen basiert auf Literaturangaben über den Säuger. Ob diese Mechanismen auch auf den Fisch übertragbar sind ist unbekannt. Für einen Teil der Stoffe wurden entsprechende target-Moleküle wie die β -Rezeptoren oder die COX-Enzyme in Fischen nachgewiesen werden. Unklar ist jedoch, ob sie ähnliche Funktionen haben wie im Säuger und ab welchem Entwicklungsstadium sie tatsächlich vorhanden sind. Es ist also nicht auszuschließen, dass die untersuchten Substanzen nicht in irgendeiner Form ähnliche Wirkmechanismen im Embryo haben.

4.3 Zusammenfassung der Kombinationsexperimente

Ziel war es die Kombinationswirkung verschiedener Pharmaka und Pestizide zu untersuchen. Es wurden Vorhersagen nach den beiden Konzepten *Konzentrationsadditivität* und *Unabhängiger Wirkung* auf Basis der Toxizitätsdaten der Einzelstoffe kalkuliert und mit den experimentell ermittelten Daten verglichen. Es wurden Mischungen aus Substanzen ähnlicher wie auch unähnlicher Wirkmechanismen untersucht.

Dafür wurden Mischungen der Substanzklassen der Analgetika und der Pestizide sowie eine Mischung bestehend aus Stoffen verschiedener Substanzklassen mit unähnlichen Wirkmechanismen getestet. Diese Mischungen umfassten maximal fünf Stoffe und enthielten die Komponenten in einem konstanten Mischungsverhältnis basierend auf der $LC_{20}(48h)$ bzw. der $LC_{50}(48h)$ der Einzelstoffe (Vorversuche Analgetika nach dem *modified toxic unit approach*). Für die Vorversuche der Analgetika nach Cleuvers (2003) wurden jeweils ein fünftel der einzelnen LC_x -Konzentrationen verwendet.

Ebenso wurden multiple Mischungen auf Basis der $LC_{10}(48h)$ bzw. $LC_{20}(48h)$ untersucht. In beiden Ansätzen wurden jeweils eine Kombination aus 8 Stoffen mit unähnlichen Wirkmechanismen sowie eine Kombination aus 14 Stoffen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen getestet. Des Weiteren wurden drei Mischungen auf Basis der NOEC untersucht, sowie drei Mischungen auf Basis subletaler Effekte.

Die genannten Untersuchungen wurden mit dem Embryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*, *DarT*) durchgeführt. Als Toxizitätsparameter dienten zum einen die vier, nach Schulte und Nagel (1994), als letale definierten Endpunkte, fehlende Somiten, fehlende Schwanzablösung vom Dotter, fehlender Herzschlag sowie die Koagulation der Embryonen. Zum anderen wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Für die Versuche auf Basis subletaler Effekte wurden „reduzierte oder fehlende Pigmentierung“, „fehlender Blutkreislauf“ sowie „Deformationen“ als Bezugspunkte gewählt.

Die Modellierung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen erfolgte durch fallweise Auswahl des „best fitting“-Modells der drei, in der Ökotoxikologie gebräuchlichen Standardmodelle Probit, Logit und Weibull.

In allen untersuchten Mischungen zeigten sich Effekte in Konzentrationen, die allein appliziert keinen oder nur einen geringen Effekt hervorrufen würden.

Anhand der Vorversuche mit der Substanzklasse der Analgetika zeigte sich eine Beeinflussung der Ergebnisse von Kombinationsexperimenten durch die Auswahl des Endpunktes. In beiden untersuchten Modellen (nach Cleuvers, 2003; nach dem *modified toxic unit approach* nach Pape-Lindstrom & Lydy, 1997) zeigte sich eine weniger als additive Mischungstoxizität, wenn alle vier als letal definierten Endpunkte zur Berechnung der $LC_{50}(48h)$ herangezogen wurden. Wurde die $LC_{50}(48h)$ hingegen ausschließlich unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen berechnet, zeigte sich eine mehr als additive Mischungstoxizität. Für alle weiteren Untersuchung der einzelnen Pharmaka und Pestizide (Einzelstoff- und Mischungsexperimente) wurden daher nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet und die LC_x -Werte entsprechend berechnet.

Die Toxizität aller Mischungen, d.h. sowohl die Toxizität für Mischungen aus Substanzen ähnlicher als auch die Toxizität für Mischungen aus Substanzen unähnlicher Wirkmechanismen, wurde sehr gut durch das Modell der *Konzentrationsadditivität* beschrieben, wohingegen das Modell der *Unabhängigen Wirkung* die Toxizität der Mischungen unterschätzte.

In den drei Mischungen auf Basis der NOEC-Werte der Einzelstoffe koagulierten alle eingesetzten Embryonen innerhalb von 12 Stunden nach Expositionsbeginn. Es zeigte sich, dass auch geringe Konzentrationen von Einzelstoffen, die allein appliziert mehr oder weniger keinen Effekt hervorrufen würden, zu einer deutlichen Mischungstoxizität führen können. Dies gilt sowohl für Mischungen partiell ähnlich wirkender als auch für Mischungen unähnlich wirkender Stoffe. In den drei untersuchten Ansätzen lagen sämtliche Mischungskomponenten in Konzentrationen vor, die nach statistischer Schätzung allein jeweils Effekte unter 1% auslösen würden. Es resultierte jedoch in allen drei Proben jeweils ein Gesamteffekt der Testgemische von 100% daraus.

Die Vorversuche auf Basis subletaler Effekte lieferten keine mit den beiden Vorhersagekonzepten auswertbaren Ergebnisse, so dass hier weiterer Forschungsbedarf besteht.

5 Abschließende Betrachtung

Die Ergebnisse zeigen, dass der Embryotest für die Untersuchung von Pharmaka als Einzelstoffe geeignet ist, was aufgrund früherer Arbeiten (Zeller, 1995; Bachmann, 2002) zu erwarten war. Auch für die Untersuchung der Kombinationswirkung von Pharmaka ist der Embryotest ein gutes „Modell“.

Bei der Untersuchung der Einzelstoffe konnte das in der Literatur beschriebene teratogene Potential von ASS, Diclofenac und Valproinsäure bestätigt werden. Es konnte ebenfalls die Wirkung der β -Blocker auf die Herzschlagfrequenz gezeigt werden.

Bei der Untersuchung der Mischung zeigte sich unabhängig davon ob die Mischungskomponenten unähnliche oder ähnliche Wirkmechanismen hatten, immer eine additive Mischungstoxizität. Die eingesetzten Konzentrationen der einzelnen Mischungskomponenten lagen z.T. deutlich unterhalb der NOEC. Da auch in diesen Konzentrationen Effekte auftraten, ist die NOEC kritisch zu hinterfragen.

Ausgangsbasis für die Annahme ähnlicher bzw. unähnlicher Wirkmechanismen waren Literaturdaten aus Untersuchungen an Säugern. Es ist jedoch unklar, ob die getesteten Substanzen im Fisch den selben Wirkmechanismus aufweisen, auch wenn die entsprechenden target-Moleküle, wie z.B. die COX-Enzyme oder β -Rezeptoren in Fischen nachgewiesen wurden. Es ist unklar, ob die diese target-Moleküle im Fisch die selbe Funktion erfüllen und ab welchem Zeitpunkt sie in der Embryonalentwicklung vorhanden sind. Direkte Rückschlüsse von den pharmakologischen Wirkungen bei Säugern auf andere Tiergruppen wie z.B. Fische, sind daher schwierig (Fent, 2006a).

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es nicht eine Risikobewertung für die untersuchten Substanzen durchzuführen. Anhand der Einzelstoffdaten lässt sich jedoch für den Embryo als Modell für Fische abschätzen, dass akute Effekte durch die untersuchten Pharmaka wenig wahrscheinlich sind. Sowohl die ermittelten $LC_{50}(48h)$ - als auch die NOEC-Werte liegen deutlich über den, in der Umwelt gemessenen Konzentrationen, die sich im ng/L- bzw. $\mu\text{g/L}$ -Bereich bewegen. Daher sind akute Wirkungen nur bei Unfällen oder an stark kontaminierten Stellen zu erwarten.

Jedoch hat die Untersuchungen der Kombinationswirkung gezeigt, dass Effekte noch im Bereich der NOEC und auch darunter zu beobachten sind, unabhängig von der Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit der Wirkmechanismen der untersuchten Substanzen. Die Mischungstoxizität sollte also unbedingt im Rahmen des Risk Assessment berücksichtigt werden.

6 Literatur

- ABBOTT, 2004. Erythrocin® i.v., Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz®, www.kompodium.ch (07.12.2005)
- ACROS ORGANICS, 1996a, 2-(4-Chlorphenoxy)-2-Methylpropionic acid, 99%, Sicherheitsdatenblatt
- ACROS ORGANICS, 1996b, Theophylline, Sicherheitsdatenblatt
- ACROS ORGANICS, 2000, Tamoxifen citrate, Sicherheitsdatenblatt
- ACROS ORGANICS, 2005, Carbamazepine, 99%, Sicherheitsdatenblatt
- ACROS ORGANICS, 2005, Erythromycin, Sicherheitsdatenblatt
- ACROS ORGANICS, 2006, Acetylsalicylic acid, Sicherheitsdatenblatt
- ALFA AESAR, 2004a, Clofibrac acid, Sicherheitsdatenblatt
- ALTANA PHARMA, 2004, Euphyllin®N, Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz®, www.kompodium.ch (13.12.2005)
- ALTENBURGER, R., BÖDEKER, W., FAUST, M., GRIMME, L., H., 1990, Evaluation of the Isobologram Method for the Assessment of Mixtures of Chemicals, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 20, 98- 114
- ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., BOEDEKER, W., FAUST, M., SCHOLZE, M., GRIMME, L., H., 2000, Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2341- 2347
- ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., 2000. Der Faktor Zeit bei der Beurteilung von biologischen Wirkungen, in: Mücke, W., Link M., *Biotests in der Praxis*, Institut für Toxikologie und Umwelthygiene, Technische Universität München
- ANSARI B., A., KUMAR, K., 1986, Malathion Toxicity: Embryotoxicity and Survival of Hatchlings of Zebrafish (*Brachydanio rerio*), *Acta hydrochim. Hydrobiol.* 14 (6), 567- 570
- ARGE-ELBE, Arbeitsgemeinschaft für die Reinerhaltung der Elbe, 2002, *Arzneistoffe in Elbe und Saale*
- ASTRAZENECA, 1992, Bricanyl®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz®, www.kompodium.ch (13.12.2005)
- ASTRAZENECA, 2002, Inderal®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz®, <http://www.kompodium.ch> (13.12.2005)
- ASTRAZENECA, 2003, Beloc ZOK® 25, 50, 100, 200, Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz®, www.kompodium.ch (12.12.2005)
- AMG (2008), Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl I S. 3394) zuletzt geändert durch Artikel 9 Abs. 1 des Gesetzes vom 23. Oktober 2007 (BGBl I S. 2631)
- ANDERSON, T., LYDY, M., J., 2002, Increased Toxicity to Invertebrates associated with a Mixture of Atrazine and Organophosphate Insecticides, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 7, 1507-1514
- AVENTIS PHARMA, 2001, Rulid®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz®, www.kompodium.ch (07.12.2005)
- AVP, *Arzneiverordnung in der Praxis*, 2006, Band 33, Ausgabe 3, herausgegeben von der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
- BACHMANN, J., 1996, Wirkung von Chemikalien auf die Embryonalentwicklung des Zebraärlings (*Brachydanio rerio*), Diplomarbeit, Institut für Hydrobiologie der TU Dresden
- BACHMANN, J., 2002, Entwicklung und Erprobung eines Teratogenitäts- Screening Testes mit Embryonen des Zebraärlings *Danio rerio*, Dissertation, Fakultät für Forst,- Geo,- und Hydrowissenschaften der TU Dresden

- BACKHAUS, T., ALTENBURGER, R., BOEDEKER, W., FAUST, M., SCHOLZE, M., GRIMME, L., H., 2000, Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fisheri*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2348-2356
- BARCELO, D., PETROVIC, M., DE ALDA, M., J., L., HERNANDO, M., D., 2006, Recent advances in LC-MS/ MS analysis of emerging contaminants in environmental samples, www.cid.csic.es/emco/Opatija-Damia.pdf
- BAXTER, 2003, Endoxan®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (08.12.2005)
- BAXTER, 2004, Holoxan®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (12.12.2005)
- BAZYLAK, G., NAGELS, L., J., 2003, Simultaneous high-throughput determination of clenbuterol, ambroxol and bromhexine in pharmaceutical formulations by HPLC with potentiometric detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 32, 887- 903
- BERENBAUM, M., C., 1985, The Expected Effect of a Combination of Agents: the General Solution, *Journal of Theoretical Biology*, 114, 413- 431
- BLAC, 1998, Bund/ Länderausschuss für Chemikaliensicherheit, Auswirkungen der Anwendung von Clofibrinsäure und anderer Arzneimittel auf die Umwelt und Trinkwasserversorgung, <http://blak-uis.server.de/servlet/is/2146/P-2a.pdf>
- BLAC, 1999, Bund/ Länderausschuss für Chemikaliensicherheit, Arzneimittel in der Umwelt, Konzept für ein Untersuchungsprogramm, <http://blak-uis.server.de/servlet/is/2146/P-2b.pdf>
- BLAC, 2003, Bund/ Länderausschuss für Chemikaliensicherheit, Arzneimittel in der Umwelt. Auswertung der Untersuchungsergebnisse., <http://blak-uis.server.de/servlet/is/2146/P-2c.pdf>
- BOUND, J., P., VOULVOULIS, N., 2005, Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for aquatic Contamination in the United Kingdom, *Environmental Health Perspectives*, 113 (12), 1705-1711
- BOXALL, A., B., A., KOLPIN, D., W., HALLING-SORENSEN, B., TOLLS., J., 2003, Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks?, *Environmental Science and Technology*, August 2003, 286- 294
- BOXALL, A., B., A., 2004, The environmental side effects of medication, How are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health?, *EMBO (European Molecular Biology Organization) reports* 5 (12), 1110- 1116
- BRIAN, J., V., HARIS, C., A., SCHOLZE, M., BACKHAUS, T., BOOY, P., LAMOREE, M., POJANA, G., JONKERS, N., RUNNALLA, T., BONFA, A., MARCOMINI, A., SUMPTER, J., P., 2005, Accurate Prediction of the Response of Freshwater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals, *Environmental Health Perspectives* 113, 721- 728
- BRODERIUS, S., J., KAHL, M., D., ELONEN, G., E., HAMMERMEISTER, D., E., HOGLUND, M., D., 2005, A Comparison of the Lethal and Sublethal Toxicity of Organic Chemical Mixtures to the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 (12), 3117- 3127
- BRISTOL-MYERS SQUIBB, 2003, Tamoxifen Famos, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (13.12.2005)
- BRUST, K., 2001, Toxicity of aliphatic amines on the embryo of zebrafish *Danio rerio* – experimental studies and QSAR, Dissertation, Fakultät für Forst,- Geo,- und Hydrowissenschaften der TU Dresden
- BUSQUET, F., 2008, Development of a new screening assay to identify proteratogenic compounds using Zebrafish *Danio rerio* embryo combined with an exogenous mammalian metabolic activation system (*mDarT*), Dissertation am Institut für Hydrobiologie, Fakultät Forts-, Geo- und Hydrowissenschaften, TU Dresden
- CAELO, Caesar und Lorenz GmbH, 2005, Theophyllin, Sicherheitsdatenblatt

- CALBIOCHEM, 2005, Diclofenac Sodium, Sicherheitsdatenblatt
- CALBIOCHEM, 2003, Ibuprofen, Sicherheitsdatenblatt
- CALBIOCHEM, 2003, Tamoxifen Citrate, Sicherheitsdatenblatt
- CAYMAN CHEMICALS, 2007, Fenofibrate, Product Information
- CLEUVER, M., 2002, Aquatische Ökotoxikologie ausgewählter Arzneimittel, Algentest und akuter Daphnientest, Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie, 14 (2), 85- 89
- CLEUVERS, M., 2003, Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, Toxicology Letters, 142, 185-194
- CLEUVERS, M., 2004, Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid, Ecotoxicology and Environmental Safety, 59, 309-315
- CLEUVERS, M., 2005, Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment, Chemosphere, 59, 199-205
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1996, Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances, Part II, Environmental Risk Assessment, Office for official publications of the European Communities, Luxembourg
- COOK, L., W., PARADISE, C., J., LOM, B., 2005, The Pesticide Malathion Reduces Survival and Growth in Developing Zebrafish, Environmental Toxicology and Chemistry 24 (7), 1745- 1750
- DAMSTRA, T., BARLOW, S., BERGMAN, A., KAVLOCK, R., VAN DER KRAAK, G., 2002, Global assessment of the state- of- the- science of endocrine disruptors, WHO/PCS/EDC/02.2
- DAUGHTON, C., G., TERNES, T., A., 1999, Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?, Environmental Health Perspectives, Special Report, Vol. 107, Supplement 6, 907- 937
- DAUNDERER, 2000, Klinische Toxikologie, 144. Erg.-Lfg., 4/00, 28-29
- DESITIN, 1997, Diazepam Desitin®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz®, www.kompodium.ch
- DEYOUNG, D., J., BANTLE, J., a., HULL, M. A., BURKS, S., L., 1996, Differences in Sensitivity to Developmental Toxicants as Seen in Xenopus and Pimephales Embryos, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 56, 143- 150
- DIN 38415-6, 2003, Suborganismische Testverfahren, Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen; Bestimmung der akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen, DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- DR.EHRENSTORFER, 2002, Parathion-methyl, Certificate of Analysis
- DR.EHRENSTORFER, 2003, Malathion, Certificate of Analysis
- DR.EHRENSTORFER, 2005a, Metoprolol tartrate, Certificate of Analysis
- DR.EHRENSTORFER, 2005b, Paracetamol, Certificate of Analysis
- DR.EHRENSTORFER, 2005c, Tamoxifen citrate, Certificate of Analysis
- DR.EHRENSTORFER, 2006, Clenbuterol hydrochloride, Certificate of Analysis
- EATON, R., C., FARLEY, R., D., 1974, Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory, COPEIA, 1
- EMBLIDGE, J., P., DELORENZO, M., E., 2006, Preliminary risk assessment of the lipid-regulating pharmaceutical clofibrac acid, for three estuarine species, Environmental Research 100, 216- 226
- EMEA, 1997, Committee for Veterinary Medicinal Products, Trimethoprim, Summary Report (2), EMEA/MRL/255/97-FINAL
- EMEA, 1998, Committee for Veterinary Medicinal Products, Atropine, Summary Report, EMEA/MRL/517/98-FINAL

- EMEA, 1999, Committee for Veterinary Medicinal Products, Paracetamol, Summary Report, EMEA/MRL/551/99-FINAL
- EMEA, 2000a, Committee for Veterinary Medicinal Products, Clenbuterol Hydrochloride, Summary Report (1), EMEA/MRL/030/95-FINAL
- EMEA, 2000b Committee for Veterinary Medicinal Products, Erythromycin-Erythromycin Thiocyanate-Erythromycin Stearate, Summary Report (1; 10.08.2006)
- EMEA, 2000c, Committee for Veterinary Medicinal Products, Erythromycin, Summary Report (2), EMEA/MRL/720/99-FINAL
- EMEA, 2003, Committee for Veterinary Medicinal Products, Acetylsalicylic Acid, Sodium Acetylsalicylate, Acetylsalicylic Acid DL- Lysins and Carbasalate Calcium, Summary Report (1), EMEA/MRL/695/99-FINAL
- EMEA, 2004, Committee for Veterinary Medicinal Products, Diclofenac, Summary Report, EMEA/MRL/885/03-FINAL
- EMEA, 2006, Committee for Veterinary Medicinal Products, Chloramphenicol, Summary Report
- EMEA, 2007, Committee for Veterinary Medicinal Products, Acetylcysteine, Summary Report
- EMEA, 1999, Acetylsalicylic acid, Sodium Acetylsalicylate, Acetylsalicylic acid DL-Lysine and Carbasalate Calcium, Summary Report (1), EMEA/MRL/695/99-FINAL
- ENGELMANN, ROHDE, ZIEGLER 2005, Arzneimittelwirkstoffe in Abwassereinleitungen und Gewässern in Sachsen, Freistaat Sachsen, Landesamt für Umwelt und Geologie
- ENSENBACH, U., 1987, Kinetik, akute Toxizität und Verteilung von Umweltchemikalien bei Ei des Zebraäbrblings (*D. rerio*), Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- ENSENBACH, U., 1991, Kinetik und Dynamik von Fremdstoffgemischen beim Zebraäbrbling (*Brachydanio rerio*), Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- FAIRHURST, A., S., WHITTAKER, M., L., EHLERT, F., 1980, Interactions of D600 (Methoxyverapamil) and Local Anaesthetics with Rat Brain α -Adrenergic and Muscarinic Receptors, *Biochem. Pharmacol.*, 29, 155- 162
- FAUST, M., ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., BOEDEKER; W., SCHOLZE, M., GRIMME; L., H., 2000, Predictive assessment of the aquatic toxicity of multiple chemical mixtures, *Journal of Environmental Quality*, 29 (4), 1063- 1068
- FAUST, M., ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., BLANCK, H., BOEDEKER, W., GRAMMATICA, P., HAMER, V., SCHOLZE, M., VIGHI, M., GRIMME, L., H., 2003, Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action, *Aquatic Toxicology*, 63, 43- 63
- FELDMANN, D., F., 2005, Modellberechnungen zum Verhalten und Verbleib von Arzneimittelrückständen im Krankenhausabwasser und Beurteilungsmöglichkeiten ihres ökotoxikologischen Gefährdungspotentials, Dissertation, Fakultät III-Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin
- FENT, K., 2003, Ökotoxikologie, Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie, Thieme Verlag, 2.Auflage
- FENT, K., 2006a, Ökotoxikologische Wirkungen von Pharmazeutikarückständen auf aquatische Organismen, in Frimmel, F., H.; Müller, M., B. (Hrsg.) Heil- Lasten, Arzneimittelrückstände in Gewässern, Springer Verlag
- FENT, K., WESTON, A., A., CAMINADA, D., 2006b, Review: Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology*, 176 (2), 122- 159
- FENT, K., ESCHER, C., CAMINADA, D., 2006c, Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system, *Reproductive Toxicology*, 22, 175- 185
- FERRARI, B., PAXEUS, N., LO GIUDICE, R., POLLIO, A., GARRIC, J., 2003, Ecotoxicological Impact of Pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of

- carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 359- 370
- FERRARI, B., MONS, R., VOLLAT, B., FRAYSSE, B., PAXEUS, N., LO GIUDICE, R., POLLIO, A., GARRIC, J., 2004, Environmental Risk Assessment of Six Human Pharmaceuticals: Are the Current Environmental Risk Assessment Procedures Sufficient for the Protection of the Aquatic Environment?, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 5, 1344-1354
- FISHER, E., J., JR., ACUFF-SMITH, K., D., SCHILLING, M., A., NAU, H., VORHEES, C., V., 1994, Trans-2-ene- Valproic Acid is less Behaviourally Teratogenic Than an Equivalent Dose of Valproic acid in Rats, *Teratology* 49, 479-486
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W., FÖRSTERMANN, U., STARKE, K., 2001, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer, 8.Auflage
- FOURNIER, 2004, Lipanthyl®200M/267M/100, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (12.12.2005)
- FRAYSSE, B., MONS, R., GARRIC, J., 2006, Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 253-267
- FRIMMEL, F., H., MÜLLER, M., B., 2006, Heil-Lasten, Arzneimittelrückstände in Gewässern, Tagungsband zum 10. Berliner Kolloquium der Gottlieb Daimler- und Karl Benz-Stiftung
- FURMANEK, D., 2007, Mittelamerika im Aquarium, <http://www.mittelameriquarium.de/aquarienchemie/wasserwerte.html>
- GEROT, 2002, Neurotop® retard, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (08.12.2005)
- GLAXOSMITHKLINE, 2004, Volmax®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (13.12.2005)
- GRIENEISEN, M.L., WARREN, J.T., GILBERT, L.I., 1993, Early Steps in Ecdysteroid Biosynthesis: Evidence for Involvement of Cytochrome P-450 Enzymes, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 23, No.1, pp.13-23
- GRIMME, L., H., ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., BÖDEKER, W., FAUST, M., SCHOLZE, M., 1998, Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen, Multiple Kombinationen von unähnlich wirkenden Substanzen in niedrigen Konzentrationen, UFZ- Bericht, Nr. 25/1998, UFZ- Umweltforschungszentrum Leipzig- Halle GmbH, Leipzig
- GRIMME, L., H., ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., FAUST, M., BÖDEKER, W., SCHOLZE, M., 2000, Kombinationswirkungen von Umweltchemikalien in der Ökotoxikologie, UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 12 (4) Beitragsserien, Chemisch-biologische Teststrategien und Bewertungskonzepte
- GROSSMANN, 2002, Groprim®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (07.12.2007)
- GRÜNENTHAL, 2003, Belara, Gebrauchsinformation
- GÜNTHER, H., J., 1987, Nicht nur auf Inseln lebt der Inselbärbling, *Brachydanio kerri*, *Das Aquarium*, 213, 127- 129
- HALLARE, A.V., KÖHLER, H., R., TRIEBSKORN, R., 2004, Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to *diclofenac* and its solvent, DMSO, *Chemosphere* 56, 659- 666
- HALLING-SORENSEN, B., NIELSEN, S., N., LANZKY, P., F., INGERSLEV, F., LUTZHOFT, H., C., H., JORGENSEN, S., E., 1998, Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A review, *Chemosphere* 36 (2), 357-394
- HART, N., H., YU, S., 1980, Cortical Granule Exocytosis and Cell Surface Reorganization in Eggs of *Brachydanio*, *The Journal of Experimental Zoology*, 213, 137-159

- HEATH, A., J., 2002, Monograph on Atropine, Antidots for Poisoning by Organophosphorus Pesticides, International Programme on Chemical Safety Evaluation, www.inchem.org/documents/antidote/antidote/atropine.htm (02.05.2006)
- HEITZMAN, R., J., 2006, Clenbuterol, first draft, www.fao.org/docrep/W4601E/w4601e06.htm (04.05.2006)
- HELVEPHARM, 1991, Propranolol Helvepharm, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (13.12.2005)
- HLEVEPHARM, 2001, Diclofenac Helvepharm, Filmtabletten/ Retardtabletten/ Suppositorien, Fachinformation des Arzneimittelkompendium der Schweiz WWW- ADRESSE!!!!!!!!!!
- HELVEPHARM, 2004, Ibuprofen Helvepharm, Fachinformation des Arzneimittelkompendium der Schweiz WWW- ADRESSE!!!!!!!!!!
- 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
- HENSCHEL, K.-P., WENZEL, A., DIEDRICH, M., FLIEDNER, A., 1997, Environmental Hazard Assessment of Pharmaceuticals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 25, 220-225
- HERMENS, J., LEEUWANGH, P., 1982, Joint Toxicity of Mixtures of 8 and 24 Chemicals to the Guppy (*Poecilia reticulata*), *Ecotoxicology and Environmental Safety* 6, 302- 310
- HERMENS, J., CANTON, H., JANSSEN, P., DE JONG, R., 1984a, Quantitative Structure-Activity Relationships and Toxicity Studies of Mixtures of Chemicals with Anaesthetic Potency: Acute Lethal and Sublethal Toxicity to *Daphnia magna*, *Aquatic Toxicology* 5, 143- 154
- HERMENS, J., CANTON, H., STEYGER, N., WEGMAN, R., 1984b, Joint Effects of a Mixture of 14 Chemicals on Mortality and Inhibition of Reproduction of *Daphnia magna*, *Aquatic Toxicology* 5, 315- 322
- HERMENS, J., LEEUWANGH, P., MUSCH, A., 1984, Quantitative Structure-Activity Relationships and Mixture Toxicity Studies of Chloro- and Alkylanilines at an Acute Lethal Toxicity Level to Guppy (*Poecilia reticulata*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8, 388- 394
- 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 (1), 41-54
- HERTL, J., 1992, Anreicherung, Verteilung und Metabolismus von 3,4- Dichloranilin in verschiedenen Entwicklungsstadien von Guppy (*Poecilia reticulata*) und Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*), Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- HISAOKA, K.K., BATTLE, H.I.; 1958, The Normal Developmental stages Of The Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton- Buchanan), *Journal of Morphology* 102, 311- 328
- HOEGER, B., KÖLLNER, B., DIETRICH, D., R., HIRTFELD, B., 2005, Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. *vario*), *Aquatic Toxicology* 75, 53- 64
- HOOVER, R., Stanley, J., Turner, P., BROOKS, B., 2003, Ecotoxicity of select antiestrogens to freshwater organisms, Poster PT080, 24th SETAC Annual Meeting in North America
- IBABE, A., GRABEBAUER, M., BAUMGART, E., FAHIMI, H., D., CAJARAVILLE, M., P., 2002, Expression of peroxisome proliferator- activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*), *Histochemistry and Cell Biology*, 118 (3), 231- 239
- IBABE, A., BILBAO, E., GAJARAVILLE, M., P., 2005a, Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*) depending on gender and developmental stage, *Histochemistry and Cell Biology*, 123, 75- 87

- IBABE, A., HERRERO, A., CAJARAVILLE, M., P., 2005b, Modulation of peroxisome proliferator- activated receptors (PPARs) by PPAR alpha- and PPAR gamma- specific ligands and by 17 beta- estradiol in isolated zebrafish hepatocytes, *Toxicology in vitro*, 19 (6), 725- 735
- JENAPHARM, 2005, Oxytetracyclin-Augensalbe, Gebrauchsinformation
- JUNGHANS, M., BACKHAUS, T., FAUST, M., SCHOLZE, M., GRIMME, L., H., 2003, Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction, *Pest Management Science*, 59, 1101- 1110
- KEHRER, A., 2004, Die Wirkung von Gemischen auf die Embryonalentwicklung des Zebraäbrblings (*Danio rerio*), Diplomarbeit, Technische Universität Dresden
- KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R., ULLMANN, B., SCHILLING, T.F., 1995, *Developmental Dynamics- An Official Publication of the American Association of Anatomists*, Vol. 203, No. 3
- KLAUA, J., 2004, Funktionelle und morphologische Veränderungen der Retina von Mäusen nach chronischer Gabe von Tamoxifen, Dissertation, Martin Luther- Universität Halle- Wittenberg
- KNOX, C., 2008, Chloramphenicol, <http://www.drugbank.ca/cgi-bin/show-drug.cgi?CARD=APRD00862>
- KNOX, C., 2008, Clarithromycin <http://www.drugbank.ca/cgi-bin/show-drug.cgi?CARD=D801211>
- KNOX, C., 2008, Oxytetrazyklin <http://www.drugbank.ca/cgi-bin/show-drug.cgi?CARD=D800595>
- KNOX, C., 2008, Roxithromycin <http://www.drugbank.ca/drugs/D800778>
- KNOX, C., 2008, Salbutamol http://www.drugbank.ca/cgi-bin/show_drug.cgi?CARD=APRD00553
- KNOX, C., 2008, Terbutaline <http://www.drugbank.ca/dugs/D800871>
- KNOX, C., 2008, Verapamil <http://www.drugbank.ca/dugs/D800661>
- KOCH, R., 1991, Umweltchemikalien- Physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverhalten, VCH Verlag, 2.Auflage
- KÖNEMANN; H., 1981, Fish Toxicity Tests with Mixtures of More than TWO Chemicals: A Proposal for A Quantitative Approach and Experimental Results, *Toxicology*, 19, 229- 238
- KOHL, R., 2002, Spurenanalytische Erfassung zytostatisch wirksamer Stickstoff-Lost-Derivate in aquatischen Umweltkompartimenten mittels gaschromatographischer Verfahren, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- KUMAR, K., ANSARI, B., A., 1984, Malathion Toxicity: Skeletal Deformities in Zebrafish (*Brachydanio rerio*, Cyprinidae), *Pestic. Sci.* 15, 107- 111
- 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
- LANDESUMWELTAMT BRANDENBURG, 2002, Ökotoxikologische Bewertung von Humanarzneimitteln in aquatischen Ökosystemen, Studien und Tagungsberichte, Band 39
- LANGE, M., 1993, Vergleich von Embryotest und Zellkultur als mögliche Alternativen zum akuten Fischtest, Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg- Universität Mainz
- LELE, Z., KRONE, P., H., 1996, The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research, *Biotechnology Advances*, 14 (1), 57-72
- LICHTENFELD, J. T., WILCOXON, F., 1949, A simplified method of evaluating dose-effect experiments, *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96, 99-113
- LIEBIG, M., 2005, Untersuchungen zu Umweltrisikoaabschätzungen von Humanpharmaka und Inhaltsstoffen von Körperpflegeprodukten vor dem Hintergrund europäischer Bewertungskonzepte, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe- Universität, Frankfurt am Main

- LÖFFLER, D., MELLER, M., RÖMBKE, J., TERNES, T., 2005., Final Report, Behaviour of selected human and veterinary pharmaceuticals in aquatic compartments and soil, UBA-Texte, 05/05
- MANSELL, J., DREWES, J., E., RAUCH, T., 2006, Removal mechanisms of endocrine disrupting compounds (steroids) during soil aquifer treatment, Water Science and Technology, Vol. 50, No. 2, 229-237
- MAIWALD, S., 1997, Wirkung von Lösungsvermittlern und lipophilen Substanzen auf die Embryonalentwicklung des Zebraäbrblings (*Danio rerio*), Diplomarbeit am Institut für Hydrobiologie der TU Dresden
- MIEGE, C., FAVIER, M., BROSSE, C., CANLER, J.-P., COQUERRY, M., 2006, Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers, Talanta 70, 739- 744
- MEPHA PHARMA, 1997, Naproxen-Mepha® 250/500, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (07.12.2005)
- MERCK, 2002a, Acetylsalicylsäure, Sicherheitsdatenblatt
- MERCK, 2002b, Concor® 2,5/5/10, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (08.12.2005)
- MERCK, 2002c, 2-Propylvaleriansäure zur Synthese, Sicherheitsdatenblatt
- MERCK, 2003a, N-Acetyl-L-cystein für biochemische Zwecke, Sicherheitsdatenblatt
- MERCK, 2003b, Lodoz® 2,5/5/10, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (08.12.2005)
- MERCK, 2003, 4-Hydroxyacetanilid, Sicherheitsdatenblatt
- MERCK, 2005, Coffein, Sicherheitsdatenblatt
- MERCK, 2006, Bisoprololhemifumarat, Sicherheitsdatenblatt
- MERSMANN, P., 2003, Transport- und Sorptionsprozesse der Arzneimittelwirkstoffe Carbamazepin, Clofibrinsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Propyphenazon in wassergesättigten und –ungesättigten Zonen, Dissertation, Technische Universität Berlin
- MOLEKULA, 2006, Sulfamethoxazole, Certificate of Analysis
- MOLEKULA, 2007, Clarithromycin, Certificate of Analysis
- MOLEKULA, 2007, Roxithromycin, Certificate of Analysis
- MOORE, M., T., GREENWAY, S., L., FARRIS, J., L., GUERRA, B., 2008, Assessing Caffeine as an Emerging Environmental Concern using Conventional Approaches, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 54, 31- 35
- NAGEL, R., 1986, Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraäbrbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.), Journal of Applied Ichthyology, 173-181
- NAGEL, R., 1988, Umweltchemikalien und Fische- Beiträge zu einer Bewertung, Habilitationsschrift, Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg- Universität Mainz
- NAGEL, R., 1998, OECD Guideline für Testing of Chemicals, Fish Embryo Toxicity Test With The Zebrafish *Danio rerio*, Draft
- NAGEL, R., 2002, *DarT*: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio*- a General Model in Ecotoxicology and Toxicology, ALTEX 19, Suppl. ½, 38 – 48
- NLM, US National Library of Medicine, 2008, Clarithromycin, http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=Search&actionHandle=getAll3DMViewFiles&nextPage=jsp%2Fcommon%2FChemFull.jsp%3FcalledFrom%3Dlite&chemid=081103119&formatType=_3D
- NOVARTIS PHARMA, 2002, Tegretol®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (08.12.2005)
- OAKS, L., J., GILBERT, M., VIRANI, M., Z., WATSON, R., T., METEYER, C., U., RIDEOUT, B., A., SHIVAPRASAD, H., L., AHMED, S., CHAUDHRY, M., J., I., ARSHAD, M., MAHMOOD, S., ALI, A., KHAN, A., A., 2004, Diclofenac residues as cause of vulture population decline in pakistan, Nature, 427, 630- 633

- OECD GUIDELINE NO. 202, 1992, *Daphnia sp.*, Acute Immobilization Test, adopted 4th April 1984
- OECD GUIDELINE NO. 203, 1992, Fish, Acute Toxicity Test, adopted 17th July 1992
- OECD GUIDELINE NO. 210, 1992, Fish, Early-life Stage Toxicity Test, adopted 17th July 1992
- OECD GUIDELINE NO. 212, 1998, Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages, adopted 21st September 1998
- PAPE-LINDSTROM, P., A., LYDY, M., J., 1997, Synergistic Toxicity of Atrazine and Organophosphate Insecticides contravenes the Response Addition Mixture Model, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 16, No. 11, 2415-2420
- REBMANN, R., 2005, Cyclophosphamid, <http://www.gifte.de/Chemikalien/cyclophosphamid.htm>
- RICHTER, G., 1999, Eignung des Embryotests mit *Danio rerio* als Biomonitor für Fließgewässer, Diplomarbeit im Institut für Hydrobiologie, Fakultät für Forts,- Geo- und Hydrowissenschaften, Technische Universität Dresden
- RIEDEL-DE-HAEN, 2007, Salbutamol hemisulphate, Certificate of Analysis
- RIPPEN, 1990, Handbuch Umweltchemikalien, Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften, ecomed-Verlag, 3. Auflage
- RITZ, C., STREIBIG, J., C., 2005, Fitting dose-response curves from bioassays to toxicity testing, *Bioassay Analysis using R. J. statistic software*, 12 (5)
- ROBERTS, B., 1998, Tamoxifen Citrate (Novaldex), www.mesomorphosis.com/steroid-profiles/novaldex.htm
- ROCHE, 2003, Cedur®retard, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (08.12.2005)
- RÖNNEFAHRT, I., KOSCHORRECK, J., KOLOSSA-GEHRING, M., 2002, Arzneimittel in der Umwelt- Teil 2: Rechtliche Aspekte und Bewertungskonzepte, *Mitteilungsblatt der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie*, 8. Jahrgang, 2002/4
- ROEX, E., W., M., VAN LANGEN, M., C., T., VAN GESTEL, C., A., M., 2002a, Acute Toxicity of Two Compounds with Different Modes of Action to the Zebrafish, *Danio rerio*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68, 269- 274
- ROEX, E., W., M., DE VRIES, E., VAN GESTEL, C., A., M., 2002b, Sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*) early life stage test for compounds with different modes of action, *Environmental Pollution* 120, 355- 362
- ROHR, J., R., ELSKUS, A., A., SHEPHERD, B., S., CROWLEY, P., H., MCCARTHY, T., M., NIEDZWIECKI, J., H., SAGER, T., SIH, A., PALMER, B., D., 2003, Lethal and Sublethal Effects of Atrazine, Carbaryl, Endosulfan, and Octylphenol on the Streamside Salamander (*Ambystoma barbouri*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 22, No. 10, 2385- 2392
- ROOSEN-RUNGE, E.C.: 1938, On The Early Development- Bipolar Differentiation and Cleavage- Of The Zebra Fish, *Brachydanio rerio* *The Biological Bulletin*, 1938/75, 119- 133
- ROTH, 2008, Coffein, Sicherheitsdatenblatt
- RXLIST, 2008, Inderide, Drug Description, <http://www.rxlist.com/cgi/generic/inderide.htm>
- SANDER, K., 1983, Das Experiment: Auslösung von embryonalen Fehlbildungen beim Zebrabärbling, *Biologie in unserer Zeit*, 13, 87- 94
- SANDER, K.; BAUMANN, M.: 1983: Auslösung von embryonalen Fehlbildungen beim Zebrabärbling, *Biologie in unserer Zeit*, 13. Jahrg., 1983/3, 87- 94
- SANDOZ, 2002, Bisoprolol Sandoz® 5/10, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (08.12.2005)
- SANDOZ, 2005, Clarithromycin Sandoz 125/250, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (07.12.2005)
- SANDRA, P., TIENPONT, B., DAVID, F., 2003, Stir Bar Sorptive Extraction (Twister™) RTL-CGS-MS, A Versatile Method to Monitor more than 400 Pesticides in different Matrices

- (Water, Beverages, Fruits, Vegetables, Baby Food), Research Institute for Chromotography, Application Note 2003-1, www.richrom.com/assets/appnote2003-1.pdf
- SANKYO, 2004, Lopresor OROS/- mite, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (12.12.2006)
- SANOFI-SYNTHELABO, 2003, Depakine®Chrono, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (14.12.2005)
- SATTELBERGER, R., 1999, Arzneimittelrückstände in der Umwelt. Bestandsaufnahme und Problemdarstellung, Report R-162, Umweltbundesamt Österreich, <http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/R162.pdf>
- SCHÄFER, 1988, Untersuchungen zum Reproduktionsverhalten und zur Populationsdynamik des Zebraäbrblings (*Brachydanio rerio* Ham.-Buch.) in einem naturnahen Laborsystem, Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Institut für Zoologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- SCHÄFERS, C., NAGEL, R., SEITZ, A., 1989, Verhalten, Reproduktion und Populationsdynamik des Zebraäbrblings (*Brachydanio rerio* Ham.-Buch.) in einem naturnahen Laborsystem, *Fischökologie*, 1(2) 45-59
- SCHOLZE, M., BOEDEKER, W.; FAUST, M., BACKHAUS, T., ALTENBURGER, R., GRIMME, L., H., 2001, A general best-fit method for concentration-response curves and estimation of low-effect concentrations, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (2), 448-457
- SCHOLZE, M., BACKHAUS, T., 2002, Principles of the experimental design of mixture studies involving vertebrates, www.the-ace-project.info
- SCHULTE, C., 1997, Entwicklung und Validierung einer Methode zur Ermittlung der Toxizität von Chemikalien gegenüber Embryonen von *Brachydanio rerio*, Dissertation, 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
- SCHWAIGER, J., FERLING, H., MALLOW, U., WINTERMAYR, H., NEGELE, R., D., 2004, Toxic Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac, Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout, *Aquatic Toxicology* 68, 141- 150
- SCHWARTZ, A., 1994, Molecular studies of the calcium antagonist binding site on calcium channels, *Am. J. Cardiol.*, 73(6), 12B-14B
- SCIENCE LAB.COM, 2005a, Naproxen, Material Safety Data Sheet
- SCIENCE LAB.COM, 2005, Trimethoprim, Material Safety Data Sheet
- SERVA ELECTROPHORESIS, 2005, Trimethoprim reinst, Analysenzertifikat
- SIGMA-ALDRICH, 2006a, Chloramphenicol, Sicherheitsdatenblatt
- SIGMA-ALDRICH, 2006b, 17- α -Ethinyletradiol, Sicherheitsdatenblatt
- SIGMA-ALDRICH, 2006b, Fenofibrate, Sicherheitsdatenblatt
- SIGMA-ALDRICH, 2006c, Ibuprofen sodium, Sicherheitsdatenblatt
- SIGMA-ALDRICH, 2006d, Naproxen sodium, Material Safety Data Sheet
- SIGMA-ALDRICH 2006e, Salbutamol hemisulfate, Sicherheitsdatenblatt
- SIGMA-ALDRICH, 2006f, Terbutaline Hemisulfate, Sicherheitsdatenblatt
- SIGMA-ALDRICH, 2007a, Bezafibrate, Sicherheitsdatenblatt
- SIGMA-ALDRICH, 2008b, Oxytetracycline Hydrochloride, Sicherheitsdatenblatt
- SIGMA-ALDRICH, 2008, Propranolol hydrochloride, Sicherheitsdatenblatt
- SIGMA-ALDRICH/ RIEDEL DE HAEN, 2007, Salbutamol hemisulfate, Sicherheitsdatenblatt
- SILVA, E., RAJAPESKE, N., KORTENKAMP, A., 2002, Something from „Nothing“- Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOEC's Produce Significant Mixture Effects, *Environmental Science & Technology*, 36, 1751- 1756

- SOLOMON, H., M., WEIS, J., S., 1979, Abnormal Circulatory Development in Medaka Caused by the Insecticides Carbaryl, Malathion and Parathion, *Teratology* 19, 51- 62
- STAINIER, D.Y., FISHMAN, M.C., 1992, Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity, *Developmental Biology*, 153, 91- 101
- STIEN, J., 2000, Festphasenmikroextraktion (SPME)- Eine Alternative zu klassischen Extraktionstechniken, Entwicklung von Analysenverfahren zur Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln und anderen anthropogenen Stoffen aus Wässern unter Einsatz der SPME, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- STREIT, B., 1992, Lexikon Ökotoxikologie, VCH Verlag
- STREULI, 1998, Verapam®/-retard, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®®, www.kompendium.ch (14.12.2005)
- STREULI, 2004, Bellafit®N, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, www.kompendium.ch (08.12.2005)
- STROH, K., 2005, Arzneistoffe in der Umwelt, Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, BayLfU 2005-PS1/ Umweltberatung Bayern
- TERNES, T., 1998, Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers, *Water Research*, 32 (11), 3245-3260
- TERNES, T., 2000, Abbau und Verhalten von Pharmaka in aquatischen Systemen, Schriftenreihe Wasserforschung 6, Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen, 23 – 32
- TOCRIS BIOSCIENCE, 2006. Verapamil hydrochloride, Material Safety Data Sheet
- TODD, N., E., VAN LEEUWEN, M., 2002, Effects of Sevin (Carbaryl Insecticide) on Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 267- 272
- TROTZ, M., WEGNER, C., NAU, H., 1987, Valproic Acid- induced neural tube defects: reduction bei folinic acid in the mouse, *Life Sciences* 41, 103- 110
- UNIVERSITÄT ZÜRICH, Institut für Veterinärpharmakologie und –toxikologie, 2006, Tierarzneimittelkompendium; Datenbank zu Wirkstoffdaten; www.vetpharm.unizh.ch
- Acetylcystein; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000061/6911__F.htm
 - Acetylsalicylsäure; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000005/0782__F.htm
 - Atropin; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000005/1558__F.htm
 - Carbaryl; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000006/3252__F.htm
 - Clarithromycin; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00008110/3119__F.htm
 - Clenbuterol; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00003714/8279__F.htm
 - Coffein; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000005/8082__F.htm
 - Diclofenac; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00001530/7796__F.htm
 - Erythromycin; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000011/4078__F.htm
 - Ethinylöstradiol; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000005/7636__F.htm
 - Ibuprofen; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00001568/7211__F.htm
 - Malathion; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000012/1755__F.htm
 - Metoprolol; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00003735/0586__F.htm
 - Naproxen; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00002220/4531__F.htm
 - Oxytetracyclin; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000007/9572__F.htm
 - Paracetamol; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000010/3902__F.htm
 - Propranolol; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000052/5666__F.htm
 - Roxithromycin; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00008021/4831__F.htm
 - Sulfamethoxazol; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000072/3466__F.htm
 - Terbutalin; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00002303/1256__F.htm
 - Theophyllin; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000005/8559__F.htm
 - Trimethoprim; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000073/8705__F.htm
 - Valproinsäure; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000009/9661__F.htm
 - Verapamil; http://www.vetpharm.unizh.ch/WIR/00000005/2539__F.htm

- VERSONNEN, B., J., JANSSEN, C., R., 2004, Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Toxicology*, 19 (3), 198- 206
- VIATRIS GMBH, 2003, Treupel®Dolo PARACETAMOL, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®, www.kompendium.ch (07.12.2005)
- VOBACH, M., KAMMANN, U., 2003, Der Fischei-Test- Ein Toxizitätstest für ökotoxikologische Untersuchungen, *Inf. Fischwirtsch. Fischereiforsch.*, 50(3)
- VOLGER, H., Schneider, T., 2006, Erythromycin Base reinst, Spezifikation, SERVA Electrophoresis GmbH
- WALTER, H., A., 2002, Kombinationswirkung von Umweltchemikalien, Zur Analyse der milieuhängigen Mischungstoxizität von Kontaminanten mit unbekanntem Wirkungsmechanismus in umweltrelevanten Konzentrationen, Dissertation, Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg
- WALTER, H., CONSOLARO, F., GRAMMATICA, P., SCHOLZE, M., ALTENBURGER, R., 2002, Mixture toxicity of Priority Pollutants at No Observed Effect Concentrations (NOECs), *Ecotoxicology*, 11, 299- 310
- WEIS, P., WEIS, J., S., 1974, Cardiac Malformations and Other Effects Due to Insecticides in Embryos of the Killifish, *Fundulus heteroclitus*, *Teratology* 10, 263- 268
- WEISS, W., 1983, Zebras aus Bengalen, *Der Zebrabärbling, Brachydanio rerio*, *Aquarienmagazin*, 11, 576- 581
- WESTERFIELD, M., 1995, *The Zebrafish Book, A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, University of Oregon Press, distributed by the Institute of Neuroscience, University of Oregon
- WIEGAND, C., KRAUSE, E., STEINBERG, C., PLUGMACHER, S., 2001, Toxicokinetics of atrazine in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 199-205
- WIKIPEDIA, 2008
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Atropin> (13.5.2008)
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Carbaryl> (13.5.2008)
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Malathion> (13.5.2008)
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Paracetamol> (14.5.2008)
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Parathion> (13.5.2008)
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Verapamil> (13.5.2008)
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Valproins%C3%A4ure> (13.5.2008)
- WIXON, J.: 2000, *Danio rerio*, the zebrafish, *Yeast* 2000, 17, 225- 231
- WOGRAM, J., STURM, A., SEGNER, H., LIESS, M., 2001, Effects of Parathion on Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, and Carboxylesterase in three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20 (7), 1528-1531
- 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
- ZOU, J., NEUMANN, N., F., HOLLAND, J., W., BELOSEVIC, M., CUNNIGHAM, C., SECOMBES, C., J., ROWLEY, A., F., 1999, Fish macrophages express a cyclooxygenase-2-homologue after activation, *Biochemical Journal*, 340, 153- 159

7 Anhänge & Verzeichnisse

Anhang A

Tabelle 1: Herkunft und Reinheit der verwendeten Substanzen (k.A.: keine Angabe).

Substanz	Herkunft	Reinheit [%]
Analgetika		
Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich	k.A.
Diclofenac natrium	Sigma-Aldrich	k.A.
Ibuprofen natrium	Sigma-Aldrich	k.A.
Naproxen natrium	molekula	99,5
Paracetamol	Ehrenstorfer	99,5
Antibiotika		
Chloramphenicol	FlukaBiochemika	>99,0
Clarithromycin	molekula	k.A.
Erythromycin	FlukaBiochemika	>95,0
Oxytetrazyklin HCl	molekula	k.A.
Roxithromycin	molekula	96,3%
Sulfamethoxazol	molekula	99,5
Trimethoprim	Serva Electrophoresis	99,9
Antidote		
Atropinsulfat monohydrat	Acros organics	98,5
N-Acetylcystein	Sigma	99,0
Antikonvulsiva		
Carbamazepin	molekula	k.A.
Valproinsäure	Sigma-Aldrich	98,0
β-Blocker		
Bisoprololhemifumarat	Merck	100,9
Metoprolol tartrat	Ehrenstorfer	99,0
Propranolol HCl	ICN Biomedicals	k.A.
β-Sympathomimetika		
Clenbuterol HCl	Alexis	k.A.
Salbutamol hemisulfat	Riedel-de-Haen	99,9
Terbutalin hemisulfat	Sigma	k.A.
Lipid-Senker		
Bezafibrat	Sigma	k.A.
Clofibrinsäure	Aldrich	97,0
Fenofibrat	Sigma	99,0
Mix unähnlicher Wirkmechanismen		
17- α -Ethinylöstradiol	FlukaBiochemika	>98,0
Tamoxifen citrat	Ehrenstorfer	98,5
Verapamil HCl	Tocris	k.A.
Pflanzenschutzmittel		
Carbaryl	Riedel-de-Haen	99,0
Malathion	Ehrenstorfer	99,5
Parathion-methyl	Ehrenstorfer	98,5
Spasmolytika		
Coffein	Ehrenstorfer	99,5
Theophyllin	Sigma	k.A.
Zytostatika		
Cyclophosphamid	Alfa Aesar	>98%
Ifosfamid	Sigma Aldrich	k.A.

Anhang B: Rohdaten für die Ermittlung der Herzschlagfrequenzen für die untersuchten Substanzen und Mischungen (Herzschläge je 15 sec. bzw. 1 Minute; Angaben in mg/L).

Für die Hauptversuche der Mischungen sind nur die Konzentrationen dargestellt, für die die Herzschlagfrequenz bestimmbar war.

Tabelle 1: Herzschläge pro Minute; Acetylcystein (ohne pH-Einstellung).

Kontrolle		31,25 mg/L		62,5 mg/L		125 mg/L		250 mg/L		500 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
36	144	39	156	32	128	34	136	39	156		
40	160	35	140	38	152	37	148	35	140		
37	148	38	152	34	126	36	144	32	128		
39	156	39	156	33	132	35	140	34	136		
39	156	36	144	37	148	36	144	35	140		
40	160	37	148	39	156	36	144	38	152		
37	148	36	144	38	152	38	152				
39	156	37	148	40	160	33	132				
40	160	40	160	35	140	39	156				
39	156	40	160	37	148	39	156				
39	156	38	152	39	156	39	156				
37	148	39	156	35	140	40	160				
38	152	40	160	33	132	39	156				
33	132	40	160	37	148	38	152				
39	156	36	144	37	148						
39	156	39	156	39	152						
41	164	40	160	36	144						
40	160	39	156	33	132						
39	156	40	160	37	148						
		39	156								

Tabelle 2: Herzschläge pro Minute; Acetylcystein (mit pH-Einstellung).

Kontrolle		1500 mg/L		3000 mg/L		6000mg/L		120000 mg/L		24000 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
36	144	36	144	37	148	38	152	36	144	23	92
41	164	33	132	37	148	38	152	37	148		
37	148	40	160	36	144	39	156	38	152		
36	144	35	140	34	136	38	152	35	140		
38	152	37	148	39	156	23	92	37	148		
34	136	35	140	40	160	40	160	38	152		
36	144	40	160	36	144	39	156	37	148		
38	152	40	160	36	144	41	164	37	148		
25	100	39	156	38	152	37	148	38	153		
37	148	39	156	37	148	36	144	37	148		
40	160	38	152	37	148	36	144	39	156		
40	160	40	160	39	156	38	152	39	156		
36	144	38	152	34	136	37	148	37	148		
39	156	31	124	37	148	38	152	36	144		
35	140	34	136	36	144	38	152	40	160		
39	156	31	124	32	128	39	156	39	156		
38	152	30	120	38	152	38	152	37	148		
36	144	33	132	33	132	37	148	39	156		
		37	148	40	160	38	152				
				36	144	39	156				

Tabelle 3: Herzschläge pro Minute, Acetylsalicylsäure.

Kontrolle		27,92 mg/L		39,09 mg/L		54,72 mg/L		76,61 mg/L		107,26 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
43	172	32	128	12	48						
42	168	31	124	64							
41	164	33	132	14	56						
35	140	36	144	13	52						
36	144	34	136	12	48						
37	148	31	124	14	56						
38	152	37	148	12	48						
35	140	36	144	12	48						
34	136	35	140	12	48						
37	148	32	128	13	52						
35	140	36	144	9	36						
40	160	36	144	9	36						
33	132	33	132	10	40						
37	148	29	116	10	40						
35	140	28	112	10	40						
33	132	28	112	8	32						
35	140	33	132	8	32						
30	120	32	128								
34	136	29	116								
		31	124								

Tabelle 4: Herzschläge pro Minute, Atropin.

Kontrolle		4500 mg/L		6750 mg/L		10125 mg/L		15187,5 mg/L		22781,25 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
34	136	26	104	36	144	29	116	28	112	14	56
32	128	34	136	31	124	36	144	29	116		
39	156	36	144	32	128	28	112	27	108		
37	148	33	132	31	124	34	136	22	88		
33	132	33	132	31	124	32	128	24	96		
34	136	34	136	35	140	30	120	21	84		
33	132	34	136	31	124	33	132	22	88		
35	140	31	124	28	112	30	120	27	108		
36	144	31	124	33	132	32	128	25	100		
36	144	29	116	33	132	27	108	24	96		
32	128	32	128	33	132	31	124				
31	124	31	124	36	144	34	136				
34	136	33	132	32	128	27	108				
34	136	29	116	34	136	34	136				
34	136	33	132	36	144	31	124				
33	132	33	132	33	132	27	108				
33	132	30	120	32	128	30	120				
31	124	33	132	30	120						
32	128	27	108	31	124						
		34	136	32	128						

Tabelle 5: Herzschläge pro Minute, Bezafibrat (Wellplatte).

Kontrolle		6,25 mg/L		12,5 mg/L		25 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
37	148	36	144	35	140	36	144	38	152	33	132
35	140	35	140	40	160	37	148	34	136	37	148
33	132	39	156	33	132	35	140	37	148	24	96
34	136	36	144	36	144	35	140	36	144	33	132
35	140	37	148	36	144	39	156	38	152	36	144
35	140	35	140	36	144	36	144	38	152	33	132
36	144	39	156	37	148	36	144	36	144	35	140
26	104	36	144	38	152	35	140	37	148	37	148
38	152	38	152	35	140	36	144	37	148	37	148
39	156	40	160	34	136	37	148	36	144	35	140
38	152	39	156	40	160	34	136	38	152	32	128
35	140	40	160	39	156	37	148	37	148	36	144
37	148	35	140	39	156	40	160	38	152	37	148
37	148	38	152	35	140	37	148	38	152	31	124
37	148	37	148	37	148	36	144	34	136	37	148
35	140	37	148	37	148	36	144	37	148	36	144
33	132	39	156	37	148	37	148	39	156	34	136
38	152	35	140	39	156	38	152	37	148	34	136
		36	144	39	156	38	152	14	56	36	144
				38	152	37	148	37	148		

Tabelle 6: Herzschläge pro Minute, Bezafibrat (Glas)

Kontrolle		6,25 mg/l		12,5 mg/L		25 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
31	124	34	136	36	144	34	136	32	128	36	144
32	128	29	116	37	148	36	144	35	140	36	144
32	128	35	140	32	128	40	160	29	116	38	152
33	132	34	136	33	132	38	152	32	128	34	136
35	140	36	144	32	128	36	144	35	140	35	140
36	144	35	140	29	116	34	136	33	132	37	148
35	140	35	140	34	136	35	140	34	136	32	128
35	140	35	140	35	140	36	144	36	144	32	128
34	136	35	140			33	132			36	144
35	140	36	144							36	144

Tabelle 7: Herzschläge pro Minute, Bisoprolol.

Kontrolle		8000 mg/l		10059,5 mg/L		12649,1 mg/L		15905,4 mg/L		20000 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
36	144	17	68	12	48	13	52	11	44		
35	140	36	144	17	68	7	28	18	72		
35	140	10	40	13	52	12	48	7	28		
37	148	24	96	10	40	17	68				
35	140	18	72	9	36	13	52				
35	140	24	96	25	60	14	56				
37	148	16	64	9	36	7	28				
37	148	18	72	19	76	11	44				
37	148	20	80	12	48	6	24				
36	144	17	68	8	32	3	12				
36	144	18	72	18	72						
35	140	15	60	15	60						
32	128	10	40	10	40						
34	136	21	84	11	44						
38	152	11	44	9	36						
39	156	20	80								
38	152										
38	152										
37	148										

Tabelle 8: Herzschläge pro Minute, Carbamazepin.

Kontrolle		12,5 mg/L		25 mg/L		50 mg/L		100 mg/L		200 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
38	152	35	140	38	152	38	152	39	156	25	100
39	156	34	136	36	144	35	140	38	152	29	116
38	152	36	144	39	156	37	148	35	140	28	112
35	140	37	148	38	152	38	152	36	144	28	112
39	156	35	140	40	160	36	144	35	140	23	92
39	156	36	144	38	152	36	144	35	140	30	120
38	152	39	156	38	152	37	148	34	136		
37	148	37	148	37	148	39	156	33	132		
38	152	38	152	39	156	35	140	37	148		
39	156	37	148	39	156	39	156	33	132		
38	152	38	152	39	156	39	156	34	136		
38	152	38	152	39	156	40	160	33	132		
40	160	38	152	36	144	38	152	32	128		
38	152	39	156	39	156	37	148	30	120		
40	160	36	144	37	148	39	156	32	128		
37	148	39	156	40	160	37	148	41	164		
36	144	39	156	37	148	38	152	34	136		
39	156	39	156	38	152	39	156	36	144		
39	156	38	152	39	156	39	156	33	132		

Tabelle 9: Herzschläge pro Minute, Carbaryl.

Kontrolle		2,2 mg/L		3,28 mg/L		4,9 mg/L		7,31 mg/L		10,9 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
35	140	36	144	36	144	31	124	33	132	24	96
37	148	37	148	35	140	35	140	34	136	13	52
36	144	37	148	37	148	38	152	32	128	18	72
35	140	36	144	37	148	34	136	33	132		
37	148	36	144	33	132	29	116	26	104		
37	148	38	152	32	128	34	136	25	100		
38	152	36	144	35	140	32	128	20	80		
38	152	37	148	37	148	29	116	35	140		
35	140	35	140	39	156	33	132	30	120		
37	148	36	144	39	156	36	144	25	100		
37	148	38	152	39	156	35	140	32	128		
41	164	37	148	38	152	33	132	26	104		
38	152	38	152	40	160	36	140				
37	148	36	144	36	144	34	136				
38	152	38	152	36	144	36	144				
40	160	37	148	37	148	37	148				
41	164	35	140	36	144	35	140				
40	160	40	160	36	144	31	124				
40	160	33	132	37	148						
42	168			37	148						

Tabelle 10: Herzschläge pro Minute, Chloramphenicol.

Kontrolle		1111,1 mg/L		1666,67 mg/L		2500 mg/L		3750 mg/L		5625 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
41	164	12	48	22	88						
41	164	9	36	12	48						
40	160	13	52	18	72						
44	176	15	60								
41	164	12	48								
41	164	12	48								
40	160	26	104								
42	168	10	40								
40	160	23	92								
40	160	11	44								
41	164										
43	172										
41	164										
38	152										
41	164										
40	160										
39	156										
44	176										

Tabelle 11: Herzschläge pro Minute, Clarithromycin.

Kontrolle		0,63 mg/L		1,25 mg/L		2,5 mg/L		5,0 mg/L		10,0 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
37	148	36	144	37	148	37	148	38	152		
39	156	38	152	23	92	38	152	39	156		
39	156	38	152	36	144	36	144	38	152		
38	152	38	15	32	128	37	148	40	160		
36	144	37	148	40	160	38	152	39	156		
37	148	39	156	38	152	38	152	37	148		
36	144	34	136	38	152	35	140	38	152		
39	156	38	152	39	156	3	148	39	156		
37	148	38	152	39	156	39	156	38	152		
38	152	39	156	39	156	39	156	39	156		
36	144	38	152	32	128	38	152	38	152		
39	156	35	140	39	156	38	152	39	156		
39	156	39	156	40	160	39	156	38	152		
39	156	33	132	40	160	38	152	39	156		
39	156	37	148	37	148	40	160	39	156		
37	148	39	156	38	152	39	156	40	160		
38	12	39	156	39	156	39	156	40	160		
40	160	39	156	39	156	38	152	40	160		
40	10	41	164	39	156	39	156	40	160		
		40	160			38	152	40	160		

Tabelle 12: Herzschläge pro Minute, Clenbuterol.

Kontrolle		1350 mg/L		2025 mg/L		3037,5 mg/L		4556,25 mg/L		6834,38 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
35	140	14	56								
41	164										
40	160										
39	156										
41	164										
39	156										
38	152										
38	152										
38	152										
40	160										
38	152										
41	164										
39	156										
39	156										
40	160										
40	160										
38	152										
35	140										
34	13z6										
36	144										

Tabelle 13: Herzschläge pro Minute, Clenbuterol (NOEC-Test).

Kontrolle		18,75 mg/L		37,5 mg/L		75 mg/L		150 mg/L		300 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
35	140	36	144	37	148	35	140	36	144	32	128
35	140	36	144	35	140	31	124	26	104	37	148
34	136	34	136	35	140	31	124	34	136	32	128
35	140	35	140	33	132	36	144	39	156	36	144
39	156	35	140	38	152	38	152	38	152	35	140
36	144	36	144	39	156	29	116	34	136	29	116
35	140	35	140	27	108	32	128	38	152	33	132
35	140	38	152	30	120	38	152	35	140	34	136
37	148	34	136	39	156	38	152	36	144	38	152
35	140	35	140	34	136	37	148	37	148	31	124
37	148	36	144	39	156	37	148	39	156	36	144
35	140	37	148	38	152	38	152	39	156	34	136
34	136	37	148	36	144	40	160	40	160	32	128
35	140	36	144	40	160	37	148	35	140	37	148
36	144	35	140	38	152	38	152	38	152	29	116
36	144	35	140	38	152	39	156	39	156	34	136
39	156	38	152	39	156	36	144	35	140	39	156
36	144	38	152	36	144	37	148	38	152	35	140
38	152	37	148	30	120	40	160	39	156	37	148
38	152	36	144	39	156					38	152

Tabelle 14: Herzschläge pro Minute, Clofibrinsäure (ohne pH-Einstellung).

Kontrolle		28,13 mg/L		56,24 mg/L		112,5 mg/L		225 mg/L		450 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
40	160	40	160								
38	152	39	156								
40	160	40	160								
44	176	43	172								
27	108	39	156								
35	140	39	156								
41	164	39	156								
40	160	39	156								
40	160	40	160								
41	164	37	148								
39	156	36	144								
39	156	39	156								
40	160	37	148								
40	160	38	152								
40	160	40	160								
29	116	40	160								
40	160	39	156								
40	160	39	156								
41	164	40	160								
		40	160								

Tabelle 15: Herzschläge pro Minute, Clofibrinsäure (mit pH-Einstellung).

Kontrolle		37,5 mg/L		75 mg/L		150 mg/L		300 mg/L		600 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
41	164	40	160	41	164	39	156	40	160	39	156
40	160	37	148	39	156	39	156	41	164	32	128
40	160	39	156	40	160	43	172	41	164	39	156
32	128	40	160	39	156	42	168	41	164	26	104
41	164	41	164	41	164	40	160	40	160	40	160
37	148	41	164	39	156	39	156	39	156	42	168
38	152	41	164	40	160	39	156	39	156	39	156
40	160	40	160	39	156	41	164	41	164	39	156
41	164	39	156	41	164	41	164	41	164	41	164
41	164	40	160	41	164	40	160	39	156	40	160
40	160	40	160	40	160	41	164	41	164	41	164
41	164	39	156	41	164	41	164	40	160	38	152
42	168	37	148	40	160	40	160	40	160	39	156
41	164	39	156	39	156	40	160	38	152	31	124
41	164	38	152	38	152	39	156	41	164	41	164
40	160	41	164	40	160	42	168	43	172	41	164
38	152	41	164	43	172	41	164	40	160	43	172
41	164	39	156	40	160	39	156	40	160	41	164
41	164	40	160	41	164	42	168	40	160	40	160
		41	164	41	164			42	168	40	160

Tabelle 16: Herzschläge pro Minute, Coffein.

Kontrolle		500 mg/L		700 mg/L		1125 mg/l		1687,5 mg/L		2531,25 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
43	172	31	124	20	80						
41	164	24	96	19	76						
41	164	28	112	21	84						
42	168	33	132	24	96						
40	160	25	100	28	112						
41	164	21	84	18	72						
41	164	28	112	28	112						
42	168	27	108	25	100						
41	164	27	108								
39	156	26	104								
40	160	35	140								
39	156	29	116								
40	160	29	116								
43	172	32	128								
41	164	29	116								
41	164	36	144								
42	168	32	128								
40	160	31	124								
41	164	25	100								
42	168	31	124								

Tabelle 17:Herzschläge pro Minute, Coffein (NOEC-Test).

Kontrolle		20 mg/L		40 mg/L		80 mg/l		160 mg/L		320 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
39	156	38	152	38	152	37	148	36	144	30	120
44	176	40	160	40	160	38	152	36	144	26	104
42	168	39	156	38	152	39	156	38	152	32	128
41	164	40	160	41	164	40	160	37	148	36	144
39	156	38	152	39	156	40	160	37	148	20	80
37	148	40	160	36	144	40	160	36	144	38	152
37	148	38	152	40	160	37	148	40	160	35	140
37	148	39	156	38	152	39	156	40	160	35	140
36	144	38	152	40	160	40	160	38	152	29	116
40	160	40	160	37	148	38	152	38	152	34	136
36	144	40	160	40	160	40	160	35	140	33	132
38	152	40	160	40	160	39	156	37	148	33	132
41	164	37	148	42	168	38	152	37	148	25	100
39	156	40	160	39	156	35	140	35	140	23	92
40	160	40	160	40	160	39	156	36	144	36	144
39	156	40	160	43	172	38	152	39	156	25	100
35	140	37	148	41	164	37	148	35	140	31	124
39	156	39	156	39	156	36	144	37	148	28	112
36	144	39	156	40	160	36	144	35	140		
37	148	40	160	39	156	39	156	38	152		

Tabelle 18: Herzschläge pro Minute; Cyclophosphamid.

Kontrolle		1000 mg/L		200 mg/L		4000 mg/L		8000 mg/L		1600 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
38	152	32	128	28	112	20	80				
39	156	38	152	31	124						
38	152	38	152	30	120						
39	156	38	152	30	120						
37	148	33	132	26	104						
35	140	35	140	31	124						
37	148	36	144	26	104						
38	152	33	132	30	120						
36	144	35	140	25	100						
38	152	36	144	20	80						
38	152	31	124	27	108						
38	152	36	144	27	108						
30	120	31	124	26	104						
34	136	34	136	36	144						
25	100	33	132	29	116						
38	152	37	148i	26	104						
36	144	33	132	28	112						
37	158	38	152	29	116						
38	152	37	148	31	124						
				19	76						

Tabelle 19: Herzschläge pro Minute; Diclofenac (alle Endpunkte).

Kontrolle		0,89 mg/l		2,05 mg/L		4,73 mg/l		10,87 mg/L		25 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
37	148	41	164	33	132	16	64				
37	148	38	152	35	140						
38	152	42	168	21	84						
42	168	40	160	35	140						
40	160	41	164	36	144						
38	152	38	152	35	140						
39	156	40	160	33	132						
39	156	38	152	16	64						
36	144	36	144	29	116						
39	156	35	140	35	140						
39	156	38	152	37	148						
37	148	37	148	25	100						
39	156	37	148	13	52						
39	156	23	92	31	124						
40	160	34	136	34	136						
38	152	16	64	32	128						
37	148	36	144	29	116						
40	160	31	124	34	136						
39	156			34	136						

Tabelle 20: Herzschläge pro Minute; Diclofenac (koagulierte Embryonen).

Kontrolle		25 mg/L		37,5 mg/L		56,25 mg/L		84,38mg/L		126,56 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
40	160										
41	164										
41	164										
41	164										
40	160										
41	164										
41	164										
41	164										
41	164										
42	168										
40	160										
41	164										
39	156										
40	160										
39	156										
39	156										
40	160										
41	164										
41	164										

Tabelle 21: Herzschläge pro Minute ; Erythromycin.

Kontrolle		0,63 mg/L		1,25 mg/L		2,5 mg/L		5,0 mg/L		10,0 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
32	128	37	148	36	144	38	152	37	148	36	144
33	132	39	156	37	148	37	148	36	144	38	152
21	128	33	132	37	148	37	148	39 _o	156	37	148
34	136	31	124	40	160	36	144	34	136	39	156
37	148	37	148	36	144	39	156	39	156	35	140
37	148	36	144	35	140	38	152	36	144	36	144
37	148	40	160	40	160	38	152	39	156	38	152
36	144	37	148	37	148	37	148	36	144	40 _p	160
36	144	38	152	39	156	39	156	36	144	39	156
37	149	39	156	38	152	41	164	39	156	36	144
34	136	36	144	37	148	41	164	37	148	37	148
36	144	37	148	39 _o	156	38	152	40	160	37	148
36	144	37	148	39 _o	156	38	152	37	148	37	148 _i
38	152	37	148	40	160	38	152	40	160	36	144
39	156	37	148	40	160	39 _o	156	38	152	37	148
39	156	38	152	40	160	39	156	40	160	39	156
		39	156	37	148	40	160	39	156	38	152
						39	156				
						41	164				

Tabelle 22: Herzschläge pro Minute; 17- α -Ethinylöstradiol (Wellplatte).

Kontrolle		0,5625 mg/L		1,13 mg/L		2,25 mg/L		4,5 mg/L		9,0 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
41	164	41	164	35	140						
40	160	41	164	41	164						
39	156	40	160	32	128						
40	160	39	156	37	148						
41	164	42	168	38	125						
39	156	40	160	38	152						
40	160	29	116	38	152						
38	152	41	164	33	132						
40	160	42	168	33	132						
39	156	39	156	36	144						
39	156	40	160	39	156						
41	164	41	164	36	144						
41	164	42	168	38	152						
40	160	41	164	37	148						
40	160	41	164	38	152						
40	160	39	156	41	164						
41	164	29	116	38	152						
40	160	40	160	35	140						
42	168	35	140								

Tabelle 23: Herzschläge pro Minute; 17- α -Ethinylöstradiol (Glas).

Kontrolle		0,5625 mg/L		1,13 mg/L		2,25 mg/L		4,5 mg/L		9,0 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
33	132	36	144	35	140						
35	140	37	148	3	152						
38	152	40	160	3u7	148						
39	156	36	144	28	112						
36	144	36	144	35	140						
23	92	29o	156	33	132						
35	140	36	144	11	44						
38	152	37	148	33	132						
33	132	38	152	35	140						
36	144	39	156	37	148						

Tabelle 24: Herzschläge pro Minute; Fenofibrat (Wellplatte)

Kontrolle		14,81 mg/L		22,22 mg/L		33,33 mg/L		50 mg/L		75 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
40	160	38	152	40	160	41	164	40	160	41	164
35	140	43	172	43	172	41	164	40	160	40	160
43	172	42	168	41	164	39	156	40	160	43	172
43	172	39	156	41	164	43	172	40	160	41	164
43	172	43	172	41	164	39	156	40	160	42	168
39	156	41	164	41	164	40	160	40	160	41	164
43	172	41	164	41	164	37	148	36	144	43	172
41	164	42	168	41	164	34	136	40	160	41	164
38	152	39	156	41	164	40	160	38	152	42	168
40	160	41	164	40	160	40	160	33	132	41	164
41	164	41	164	41	164	39	156	39	156	35	140
40	160	42	168	41	164	36	144	39	156	41	164
40	160	38	152	39	156	38	152	41	164	41	164
41	164	41	164	40	160	41	164	40	160	41	164
41	164	41	164	41	164	41	164	41	164	40	160
42	168	41	164	40	160	42	168	40	160	41	164
40	260	39	156	42	168	40	160	41	164	39	156
41	164			40	160			40	160	40	160
				39	1567			41	164	35	140
										41	164

Tabelle 25: Herzschläge pro Minute; Fenofibrat (Glas).

Kontrolle		14,81 mg/L		22,22 mg/L		33,33 mg/L		50 mg/L		75 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
41	164	39	156	40	160	38	152	35	140	39	156
41	164	40	160	40	160	38	152	34	136	39	156
41	164	40	160	40	160	38	152	37	148	37	148
39	156	38	152	40	160	38	152	32	128	39	156
40	160	39	156	38	152	37	148	37	148	38	152
42	168	38	152	39	156	37	148	38	152	37	148
41	164	39	156	38	152	39	156	38	152	38	152
41	164	41	164	40	160	39	156	39	156	34	13641
41	164	37	148	40	160	36	144	36	144	38	152
		40	160	40	160			38	152	38	152

Tabelle 26: Herzschläge pro Minute, Ibuprofen (alle Endpunkte).

Kontrolle		5,41 mg/l		10,81 mg/L		21,63 mg/L		43,25 mg/L		86,50 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
43	172	40	160	33	132	22	88	14	56		
41	164	40	160	38	152	29	116				
43	172	39	156	33	132	26	104				
39	156	42	168	40	160	18	72				
38	152	39	156	33	132	21	84				
40	160	40	160	37	148	18	72				
40	160	37	148	40	160	23	92				
40	160	37	148	35	140	22	88				
39	156	38	152	36	144	12	48				
40	160	38	152	37	148	36	144				
37	148	38	152	36	144	19	76				
38	152	37	148	34	136	20	80				
37	148	36	144	33	132	20	80				
38	152	35	140	32	128						
35	140	36	144	35	140						
36	144	33	132	36	144						
36	144	34	136	30	120						
35	140	37	148	37	148						
35	140										
36	144										

Tabelle 27: Herzschläge pro Minute; Ibuprofen (koagulierte Embryonen).

Kontrolle		8,12 mg/L		16,23 mg/L		32,46 mg/L		64,92 mg/L		129,84 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
41	164	39	156	24	96	14e	56	14	56		
42	168	34	136	7	108	19	76				
43	172	39	156	28	112	17	68				
41	164	41	164	25	100	17	68				
39	156	37	148	24	96	21	84				
40	160	38	152	23	92	19	76				
40	160	37	148	22	88	20	80				
39	156	39	156	39	156	22	88				
38	152	38	152	25	140						
40	160	37	148	23	92						
39	156	39	156	23	92						
38	152	40	160	39	156						
41	164	37	148	20	80						
40	160	38	152	35	140						
39	156	39	156	20	80						
40	160	39	156	25	100						
40	160	37	148	28	112						
40	160	40	160	22	88						
41	164	41	164								
		41	164								

Tabelle 28: Herzschläge pro Minute; Ifosfamid.

Kontrolle		1250 mg/L		2500 mg/L		5000 mg/l		10000 mg/L		20000 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
41	164	41	164	41	164	22	88				
40	160	40	160	41	164	26	104				
41	164	41	164	41	164	24	96				
42	168	40	160	40	160	26	104				
41	164	40	160	40	160	21	84				
40	160	39	156	40	160	20	80				
39	156	40	160	40	160	26	104				
40	160	40	160	40	160	29	116				
40	160	40	160	38	152	27	108				
39	156	41	164	35	140	26	104				
41	164	42	168	34	136	27	108				
40	160	40	160	41	164	33	132				
38	152	40	160	38	152	31	124				
39	156	41	164	40	160	27	108				
39	156	41	164	42	168	26	104				
41			160	41	164	29	116				
39	156	41	164	40	160	33	132				
40	160	40	160	39	156	34	136				
40	160	40	160	37	148	29	116				
		40	160	40	160	24	96				

Tabelle 29: Herzschläge pro Minute; Malathion

Kontrolle		3 mg/L		6 mg/L		12 mg/L		24 mg/L		48 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
36	144	19	76	24	96						
31	124	21	84	21	84						
39	156	24	96	20	80						
20	80	20	80	15	60						
34	136	23	92	19	76						
39	156	16	64	20	80						
36	144	21	84	19	76						
34	136	30	120	15	60						
33	132	21	84	17	68						
35	140	31	124	22	88						
34	136	23	92	21	84						
33	132	20	80	27	108						
35	140	26	104								
32	128	15	60								
35	140	15	60								
34	136	20	80								
34	136	21	84								
32	128										
36	144										

Tabelle 30: Herzschläge pro Minute; Metoprolol .

Kontrolle		1500 mg/L		2250 mg/L		3375 mg/L		5062,5 mg/L		7593,5 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
36	144	25	100	24	96	22	88	20	80	16	64
42	168	27	108	27	108	27	108	18	72	18	72
39	156	30	120	25	100	23	92	20	80	17	68
39	156	31	124	22	88	22	88	16	64		
37	148	24	96	28	112	20	80	12	48		
35	140	31	124	32	128	21	84	14	56		
36	144	32	128	24	96	23	92	18	72		
37	148	31	124	22	88	29	116	22	88		
35	140	29	116	24	96	22	88	19	76		
37	148	32	128	29	116	24	96	9	36		
39	156	31	124	31	124	21	84	15	60		
38	152	32	128	24	96	27	108	16	64		
36	144	33	132	24	96	23	92	15	60		
43	172	33	132	18	72	21	84	19	76		
40	160	29	116	23	92	116	16	16	64		
40	160	21	128	31	124	21	84	17	68		
41	164	32	128	30	120	25	100	18	72		
40	160	32	128	32	128	14	56	15	60		
40	160	30	120	29	116	7	28	14	56		
		29	116	25	100	12	48				

Tabelle 31: Herzschläge pro Minute; Naproxen (alle Endpunkte).

Kontrolle		10,16 mg/L		20,32 mg/L		40,63 mg/L		81,26 mg/L		162,25 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
42	168	45	180	40	160	30	120	19	76		
40	160	42	168	38	152	38	152	16	64		
44	176	42	168	38	152	13	52	11	44		
40	160	41	164	36	144	36	144	19	76		
40	160	41	164	37	148	21	84	19	76		
41	164	42	168	40	160	25	100	15	60		
40	160	44	176	38	152	26	104				
40	160	41	164	42	168	32	128				
42	168	41	164	38	152	25	100				
35	140	44	176	40	160	10	40				
39	156	40	160	40	160	21	84				
37	148	39	156	33	132	23	92				
36	144	38	152	40	160	33	132				
38	152	38	152	37	148	19	76				
37	148	38	152	35	140	28	112				
		38	152	38	152	21	84				
				38	152						
				41	164						
				38	152						

Tabelle 32: Herzschläge pro Minute; Naproxen (koagulierte Embryonen)

Kontrolle		27,09 mg/L		40,63 mg/L		60,95 mg/L		91,42 mg/L		137,13 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
42	168	17	68	39	156	17	68				
28	112	39	156	35	140	11	44				
42	168	40	160	34	136	20	80				
44	176	34	136	29	116	21	84				
40	160	39	156	29	116	25	100				
42	168	44	176	31	124	28	112				
40	160	41	164	32	128						
38	152	40	160	31	124						
39	156	40	160	40	160						
41	164	41	164	29	116						
41	164	37	148	33	132						
37	148	41	164	33	132						
38	152	42	168	38	152						
41	164	41	164	33	132						
41	164	42	168	35	140						
40	160	41	164	33	132						
34	136	39	156	37	148						
39	156	39	156								
43	172	33	132								
		41	164								

Tabelle 33: Herzschläge pro Minute; Oxytetracyclin (ohne pH-Einstellung).

Kontrolle		75 mg/L		2250 mg/L		150 mg/L		600 mg/L		1200 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
39	156	41	164	38	152	37	148	37	148		
40	160	38	152	38	152	35	140	26	104		
39	156	41	164	37	148	36	144	33	132		
44	172	40	160	40	160	32	128	33	132		
38	152	38	152	30	120	39	156	217	108		
40	160	39	156	38	152	37	148	29	116		
40	160	40	160	38	152	37	148				
41	164	40	160	37	148	39	156				
40	160	39	156	36	144	38	152				
41	164	39	156	39	156	35	140				
41	164	40	160	40	160	38	152				
38	152	39	156	39	156	35	140				
39	156	41	164	41	164	35	140				
40	160	40	160	40	160	35	140				
41	164	39	156	40	160	39	156				
40	160	39	156	41	164	38	152				
41	164	40	160	41	164	38	152				
42	168	39	156			38	152				
43	172	40	160								
		39	156								

Tabelle 34: Herzschläge pro Minute; Oxytetryklin (mit pH-Einstellung).

Kontrolle		250 mg/L		500 mg/L		1000 mg/L		2000 mg/L		4000 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
40	160	43	172	40	160	39	156				
40	160	43	172	38	152	39	156				
43	172	41	164	38	152	39	156				
43	172	40	160	37	148	40	160				
41	164	41	164	38	152	39	156				
40	160	41	164	40	160	40	160				
41	164	41	164	14	164	40	160				
40	160	41	164	39	156	40	160				
40	160	40	160	40	160	39	156				
41	164	40	160	39	156	39	156				
39	156	43	172	39	156	40	160				
42	168	41	164	40	160	39	156				
42	168	42	168	39	156	39	156				
41	164	43	172	40	160	40	160				
41	164	42	168	39	156	39	156				
40	160	39	156	40	160	39	156				
41	164	41	164	40	160	40	160				
37	148	40	160	40	160	40	160				

Tabelle 35: Herzschläge pro Minute; Paracetamol (alle Endpunkte).

Kontrolle		71,83 mg/L		165,22 mg/L		380 mg/L		874 mg/L		2010,2 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
39	156	36	144	38	152	39	156	21	84		
38	152	40	160	39	156	40	160	30	120		
38	152	40	160	39	156	44	176	7	28		
40	160	32	128	42	168	39	156	23	92		
38	152	37	148	39	156	40	160	25	100		
39	156	39	156	34	136	40	160	13	52		
42	168	39	156	34	136	41	164	7	28		
39	156	40	160	39	156	40	160	21	84		
40	160	36	144	40	160	38	152	3	12		
40	160	39	156	38	152	39	156	20	80		
41	164	40	160	39	156	38	152	31	124		
37	148	39	156	38	152	40	160	19	76		
42	168	40	160	39	156	27	108	16	64		
42	168	40	160	38	152	34	136	21	84		
39	156	39	156	40	160	39	156	34	136		
37	148	36	144	40	160	43	172	30	120		
44	176	40	160	37	148	39	156				
42	168			40	160	33	132				
43	172					42	168				
						43	172				

Tabelle 36: Herzschläge pro Minute; Paracetamol (koagulierte Embryonen).

Kontrolle		380 mg/L		760 mg/L		1520 mg/L		3040 mg/L		6080 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
40	160	29	116	24	96						
41	164	40	160	22	88						
41	164	40	160	24	96						
40	160	41	164	33	132						
41	164	39	156	15	60						
40	160	39	156	35	140						
40	160	36	140	34	136						
41	164	39	156	37	148						
42	168	38	152	13	52						
41	164	39	156	20	80						
38	152	39	156	21	84						
40	160	38	152	31	124						
42	168	40	160	31	124						
43	172	40	160	34	136						
40	160	40	160	14	56						
40	160	42	168	15	60						
41	164	39	156	20	80						
43	172	40	160	24	96						
		39	156	26	104						
		40	160								

Tabelle 37: Herzschläge pro Minute; Parathion.

Kontrolle		5 mg/L		7,5 mg/L		11,25 mg/L		16,88 mg/L			
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
39	156	28	112	23	92	15	60				
41	164	31	124	32	128						
41	164	35	140	33	132						
43	172	37	148	24	96						
34	136	35	140	19	76						
39	156	31	124	24	96						
39	156	34	136	14	56						
39	156	36	144	27	108						
37	148	33	132	20	80						
37	148	32	128	20	80						
39	156	31	124	31	124						
37	148	21	84	11	44						
37	148	33	132	21	84						
36	144	33	132								
39	156	34	136								
38	152	22	88								
		33	132								
		32	128								
		21	84								

Tabelle 38: Herzschläge pro Minute; Propranolol.

Kontrolle		36,98 mg/L		73,95 mg/L		147,91 mg/L		295,81 mg/L		591,62 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
39	156	35	140	32	128	17	68				
40	160	39	156	36	144	15	60				
43	172	37	148	29	116	13	52				
41	164	34	136	32	128	21	84				
39	156	35	140	19	76	14	56				
40	160	33	132	35	140						
39	156	35	140	33	132						
33	132	35	140	28	112						
40	160	34	136	29	116						
39	156	36	144	13	52						
39	156	36	144	28	112						
37	148	37	148	30	120						
35	140	35	140	28	112						
36	144	34	136	21	84						
38	152	36	144								
35	140	36	144								
37	148	34	136								
36	144	40	160								
36	144	38	152								
		38	152								

Tabelle 39: Herzschläge pro Minute; Roxithromycin (Wellplatte).

Kontrolle		0,63 mg/L		1,25 mg/L		2,5 mg/L		5,0 mg/L		10,0 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
41	164	38	152	35	140	36	144	39	156	40	160
36	144	40	160	37	148	36	144	37	148	37	148
37	148	39	156	34	136	38	152	40	160	37	148
40	160	38	152	40	160	38	152	38	152	37	148
41	164	40	160	36	144	39	156	35	140	37	148
40	160	40	160	39	156	39	156	36	144	40	160
40	160	41	164	15	60	36	144	39	156	36	144
40	160	40	160	35	140	19	76	37	148	35	140
37	148	40	160	39	156	38	152	39	156	40	160
38	152	37	148	37	148	40	160	40	160	38	152
38	152	40	160	35	140	37	148	36	144	39	156
39	156	38	152	38	152	37	148	36	144	39	156
40	160	39	156	38	152	40	160	37	148	40	160
40	160	38	152	40	160	40	160	39	156	40	160
40	160	39	156	39	156	39	156	40	160	40	160
40	160	39	156	39	156	40	160	39	156	41	164
40	160	39	156	39	156	40	160	40	160	41	164
40	160	37	148	38	152	40	160	36	144		
40	160			40	160	38	152	38	152		
40	160					40	160				

Tabelle 40: Herzschläge pro Minute; Roxithromycin (Glas).

Kontrolle		0,63 mg/L		1,25 mg/L		2,5 mg/L		5,0 mg/L		10,0 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
41	164	39	156	40	160	40	160	39	156	40	160
42	168	40	160	41	164	39	156	39	156	41	164
35	140	38	152	40	160	40	160	40	160	40	160
37	148	38	152	39	156	39	156	40	160	39	156
38	152	39	156	39	156	39	156	41	164	40	160
38	152	40	160	39	156	39	156	40	160	40	160
39	156	39	156	38	152	39	156	40	160	40	160
38	152	40	160	40	160	40	160	39	156	40	160
39	156	40	160	39	156	40	160			41	165
38	152	39	156	39	156	39	156			41	164
				40	160						

Tabelle 41: Herzschläge pro Minute; Salbutamol.

Kontrolle		1250 mg/L		2500 mg/L		5000 mg/L		10000 mg/L		20000 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
37	148	39	16	40	160	39	156	39	156	33	132
39	156	39	156	40	160	39	156	35	140		
40	160	41	164	40	160	39	156	39	156		
39	156	38	152	40	160	39	156	41	164		
39	156	39	156	39	156	39	156	40	160		
39	156	39	156	40	160	39	156	41	164		
36	144	40	160	40	160	39	156	39	156		
37	148	39	156	40	160	41	164	39	156		
36	144	39	156	40	160	40	160	39	156		
37	148	39	156	40	160	40	160	40	160		
40	160	40	160	40	160	39	156	39	156		
40	160	40	160	39	156	37	148	40	160		
26	104	39	156	39	156	39	156	40	160		
40	160	40	160	39	156	39	156	41	164		
39	156	39	156	40	160	41	164	39	156		
41	164	39	156	40	160	41	164	40	160		
39	156	40	160	40	160	39	156				
40	160	40	160	40	160	42	168				
40	160	40	160	40	160	42	168				
		41	164	40	160	41	164				

Tabelle 42:Herzschläge pro Minute, Sulfamethoxazol.

Kontrolle		50 mg/L		100 mg/L		200 mg/L		400 mg/L		800 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
36	144	40	160	39	156	36	144	38	152	30	120
39	156	36	144	39	156	38	152	40	160	32	128
39	156	37	148	36	144	39	156	39	156	12	48
39	156	40	160	39	156	39	156	38	152	39	156
39	156	38	152	38	152	36	144	40	160	33	132
40	160	37	148	38	152	38	152	39	156	35	140
39	156	36	144	37	148	38	152	40	160	22	88
38	152	38	152	37	148	39	156	38	152	37	148
39	156	39	156	37	148	39	156	38	152	32	128
38	152	37	148	38	152	39	156	40	160	36	144
35	140	38	152	37	148	37	148	37	148	31	124
38	152	36	144	39	156	37	148	38	152	39	156
38	152	38	152	35	140	38	152	39	156	33	132
40	160	39	156	37	148	39	156	40	160	36	144
40	160	39	156	39	156	38	152	39	156	29	116
37	148	37	148	36t	144	38	152	39	156	38	152
39	156	35	140	35	140	38	152	40	160	39	156
39	156	37	148	36	144	38	152	37	148	38	152
39	156	37	148	36	144	38	152	37	148	38	152
40	160	37	148	37	148	39	156	40	160	37	148
				35	140	38i	152	40	160	29	116

Tabelle 43: Herzschläge pro Minute; Tamoxifen; (Wellplatte)

Kontrolle		3,125 mg/L		6,25 mg/L		12,5 mg/L		25 mg/L		50 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
35	140	31	124	27	108	17	68	12	48		
34	136	21	28	23	92	19	76	14	56		
38	152	28	112	29	116	23	92	11	44		
35	140	26	104	29	116	26	104	11	44		
36	144	26	104	9	36	19	76	23	92		
33	132	28	112	16	64	8	32				
34	136	30	120	11	44	22	88				
33	132	33	132	28	112	16	64				
34	136	36	144	28	112	20	80				
35	140	34	136	30	120	20	80				
34	136	31	124	30	120	26	104				
35	140	30	120	28	112	20	80				
35	140	30	120	33	132	26	104				
36	144	33	132	32	128	25	100				
35	140	34	136	32	128	19	76				
35	140	32	128	33	132	25	100				
38	152	35	140	35	140	10	40				
37	148	36	144	34	136	16	64				
38	152	32	128	26	104	16	64				
		27	108								

Tabelle 44: Herzschläge pro Minute; Tamoxifen (Glas).

Kontrolle		3,125 mg/L		6,25 mg/L		12,5 mg/L		25 mg/L		50 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
39	156	34	136	29	116	23	92	11	44		
38	152	37	148	15	60	32	128	24	96		
40	160	35	140	31	124	12	48	21	84		
41	164	26	104	22	88	15	60	17	68		
38	152	35	140	31	124	29	116	19	76		
41	164	32	128	28	112	33	132	29	116		
40	160	35	140	27	108	24	96				
40	160	37	148	25	100	15	60				
39	156	34	136	27	108	23	92				
41	164	36	144								
41	164										
39	156										
41	164										
41	164										
40	160										
41	164										
42	168										
41	164										
38	152										

Tabelle 45: Minute; Herzschläge Terbutalin.

Kontrolle		12150 mg/L		13762,26 mg/L		15588,46 mg/L		17656,99 mg/L		20000 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
32	128	43	172	46	184	41	164	41	164	42	168
39	156	43	172	42	168	41	16	40	160	45	180
39	156	41	164	42	168	42	168	40	160	41	164
40	160	42	168	43	172	44	176	39	156	42	168
40	160	42	168	43	172	38	152	43	172	41	164
41	164	40	160	45	180	41	164	40	160	34	136
42	168	43	172	42	168	43	172	40	160	33	132
40	160	43	172	42	168	42	168	41	164	39	156
44	176	41	164	43	172	41	164	41	164	42	168
43	172	44	176	41	164	41	164	41	164	42	168
42	168	45	180	41	164	43	172	41	164	41	164
41	164	43	172	41	164	43	172	33	132	41	164
40	160	44	176	42	168	41	164	43	172	41	164
41	164	43	172	43	172	43	172	42	168	42	168
39	156	40	160	42	168	42	168	40	160	42	168
40	160	40	160	41	164	43	172	41	164	42	168
41	164	42	168	40	160	40	160				
41	164	42	168	43	172						
42	168	41	164	41	164						
40	160	41	164	40	160						

Tabelle 46: Herzschläge pro Minute; Theophyllin.

Kontrolle		257,53 mg/L		592,32mg/L		1362,34 mg/L		3133,39 mg/L		7206,8 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
46	184	46	184	43	172	30	120	15	60		
46	184	44	176	44	176z	32	128	19	76		
46	184	45	180	44	1766	31	124	32	128		
48	192	46	184	42	168	33	132	20	80		
44	17z6	43	172	42	168	25	100	21	84		
46	184	43	12	40	160	27	108	15	60		
43	172	44	176	40	160	31	124	24	96		
45	180	43	172	39	156	15	60	38	152		
44	176	44	176	38	152	32	128	18	72		
42	168	43	172	37	148	40	160	29	116		
44	176	44	176	40	160	35	140	20	80		
44	176	43	172	41	164	34	136	21	84		
40	160	45	180	34	136	39	156	19	76		
42	168	44	176	42	168	32	128	18	72		
40	160	43	172	41	164	40	160				
40	160	45	180	35	140	37	148				
44	176	43	172	42	168	39	156				
44	176	42	168	39	156	37	148				
42	168	43	172	39	156	30	120				
				43	172						

Tabelle 47: Herzschläge pro Minute; Trimethoprim.

Kontrolle		18,75 mg/L		37,5 mg/L		75 mg/L		150 mg/L		300 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
40	160	39	156	43	172	41	164	41	164	43	172
42	168	40	160	43	172	38	152	35	140	41	164
39	156	41	164	43	172	3	156	40	160	42	168
41	164	42	168	42	168	38	152	40	160	40	160
44	176	41	164	41	164	42	168	42	168	41	168
39	156	40	160	41	164	41	164	40	160	41	164
42	168	40	160	40	160	37	148	42	168	42	168
43	172	41	164	41	164	41	164	36	144	40	160
4r1	164	43	172	43	172	41	164	39	156	43	172
41	164	41	164	39	156	387	152	40	160	41	164
41	164	41	164	40	160	40	160	36	144	41	164
41	164	40	160	41	164	32	128	34	136	41	164
47	188	40	160	42	168	39	156	41	164	43	172
47	188	40	160	41	164	41	164	39	156	41	164
44	176	40	160	40	160	41	164	39	156	45	180
44	176	39	156	40	160	43	172	39	156	41	164
44	164	41	164	40	160	40	160	41	164	43	172
44	176	41	164					43	172	43	172
43	172	40	160							41	164
										43	172

Tabelle 48: Herzschläge pro Minute; Valproinsäure.

Kontrolle		6,33 mg/L		8,44 mg/L		11,25 mg/L		15 mg/L		20 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
40	160	22	88	17	68						
43	172	37	148	15	60						
41	164	31	124	17	68						
41	164	21	84	22	88						
41	164	31	124	23	92						
41	164	30	120	21	84						
43	172	20	80	32	128						
4	168	23	92	16	64						
42	168	31	124	38	152						
40	160	3	120	23	92						
42	168	36	144	17	68						
37	148	24	96	20	80						
40	160	33	132								
42	168	34	136								
40	160	17	68								
41	164	38	152								
43	172	36	144								
41	164	36	144								
42	168	36	144								
		38	152								

Tabelle 49: Herzschläge pro Minute; Verapamil.

Kontrolle		118,25 mg/L		177,78 mg/L		266,67 mg/L		400 mg/L		600 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
41	164	28	112	14	56						
41	164	25	100								
41	164	30	120								
40	160	29	116								
40	160	26	104								
39	156	32	128								
40	160	27	108								
39	156	26	104								
38	152	34	136								
36	144	25	100								
40	160	23	92								
40	160	28	112								
40	160	27	108								
40	160										
40	160										
41	164										
38	152										
40	160										
39	156										

Tabelle 50: Herzschläge pro Minute; Verapamil (NOEC-Test).

Kontrolle		25 mg/L		50 mg/L		100 mg/L		200 mg/L		400 mg/L	
15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	1 min
44	176	41	164	41	164	37	148	24	96		
40	160	41	164	39	156	35	140	23	92		
42	168	42	168	43	172	26	104	19	76		
37	148	41	164	39	156	34	136	19	76		
36	144	37	148	40	160	33	132	14	56		
38	152	40	160	43	172	38	152				
40	160	41	164	36	144	38	152				
40	160	43	172	34	136	39	156				
42	168	39	156	36	144	36	144				
39	156	33	132	35	140	32	128				
39	156	41	164	39	156	29	116				
35	140	45	180	38	152	38	152				
40	160	39	156	36	144	26	104				
38	152	41	164	39	156	38	152				
40	160	41	164	41	164	39	156				
39	156	38	152	40	160	22	88				
40	160	38	152	38	152	20	80				
40	160	40	160	35	140	33	132				
37	148	41	164	39	156	35	140				
		39	156	39	156	37	148				

Tabelle 51: Mischung Vortest Analgetika, Test 1 nach Cleuvers (2003, alle Endpunkte).

Kontrolle		LC ₅ /5		LC ₁₀ /5		LC ₂₀ /5		LC ₅₀ /5		LC ₇₀ /5	
15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min
36	144	16	64	34	136	28	112	26	104	12	48
37	148	35	140	32	128	14	56	15	60	16	64
40	160	35	140	35	140	19	76	17	68	16	64
39	156	39	156	35	140	36	144	17	68	15	60
33	132	37	148	29	116	33	132	12	48	20	80
38	152	34	136	33	132	32	128	13	52	13	52
36	144	33	132	33	132	20	80	20	80	12	48
36	144	35	140	26	104	22	88	15	60		
35	140	32	128	33	132	20	80	13	52		
37	148	34	136	32	128	14	56	17	68		
36	144	32	128	31	124	21	84	13	52		
39	156	34	136	31	124	20	80	16	64		
34	136	35	140	33	132	25	100	20	80		
35	140	33	132	31	124	27	108	20	80		
37	148	25	100	28	112	18	72				
35	140	32	128	33	132	28	112				
35	140	35	140	35	140	23	92				
39	156	37	148	34	136	34	136				
36	144	35	140	33	132	35	140				
		33	132			16	64				

Tabelle 52: Mischung Vortest Analgetika, Test 2 nach Cleuvers (2003, alle Endpunkte).

Kontrolle		LC5/5		LC10/5		LC20/5		LC50/5		LC70/5	
15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min
40	160	39	156	38	152	29	116	18	72	16	64
38	152	38	152	37	148	21	84	17	68	18	72
41	164	42	168	29	116	23	92	16	64	10	40
40	160	42	168	38	152	17	68	14	56	15	60
39	156	39	156	38	152	30	120	15	60	14	56
40	160	41	164	39	156	35	140	20	80	15	60
39	156	37	148	37	148	34	136	21	84	11	44
39	156	39	156	17	68	38	152	23	92	13	52
40	160	40	160	36	144	35	140	29	116	20	80
41	164	37	148	34	136	24	96	12	48	15	60
40	160	37	148	35	140	25	100	15	60	21	84
35	140	39	156	34	136	20	80	15	60	12	48
35	140	40	160	33	132	36	144	18	72	14	56
36	144	38	152	38	152	31	124	23	92	17	68
38	152	39	156	29	116	21	84	32	128		
39	156	38	152	37	148	24	96	17	68		
38	152	37	148	31	124	34	136	16	64		
35	140	37	148	39	156	30	120	22	88		
38	152	38	152	35	140	24	96				
		40	160	36	144	32	128				

Tabelle 53: Mischung Vortest Analgetika, Test 3 nach Cleuvers (2003, koagulierte Embryonen).

Kontrolle		LC ₁₀ /5		LC ₂₀ /5		LC ₅₀ /5		LC ₇₀ /5		LC ₉₉ /5	
15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min
41	164										
41	164										
41	164										
41	164										
44	176										
45	180										
45	180										
41	164										
40	160										
44	176										
40	160										
40	160										
41	164										
41	164										
41	164										
41	164										
41	164										
40	160										
41	164										
40	160										

Tabelle 54: Mischung Vortest Analgetika nach dem modified toxic unit approach (alle Endpunkte).

Kontrolle		0,25 TU		0,5 TU		1 TU		2 TU		4 TU	
15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min
37	148	39	156	40	160	16	64				
40	160	41	164	25	100	13	52				
41	164	41	164	40	160	25	100				
38	152	39	156	40	160	15	60				
40	160	37	148	40	160	15	60				
43	172	39	156	39	156	20	80				
40	160	39	156	39	156	14	56				
39	156	38	152	34	136	24	96				
39	156	40	160	39	156	16	64				
38	152	40	160	41	164	22	88				
39	156	39	156	40	160	19	76				
39	156	41	164	31	124	18	72				
39	156	40	160	41	164	9	36				
39	156	40	160	40	160	20	80				
40	160	41	164	39	156	21	84				
38	152	39	156	41	164	31	124				
39	156	40	160	36	144						
40	160	40	160	36	144						
41	164			37	148						
				35	140						

Tabelle 55: Mischung Vortest Analgetika nach dem modified toxic unit approach (koagulierte Embryonen).

Kontrolle		0,25 TU		0,5 TU		1 TU		2 TU		4 TU	
15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min
38	152	17	68								
43	172	27	108								
41	164	18	72								
39	156	23	92								
39	156	27	108								
41	164	7	28								
40	160	4	16								
39	156	7	28								
41	164	9	36								
43	172										
40	160										
41	164										
40	160										
41	164										
42	168										
43	172										
42	168										
41	164										
41	164										
41	164										

Tabelle 56: Mischung Vortest Analgetika nach dem modified toxic unit approach (koagulierte Embryonen, ohne Paracetamol).

Kontrolle		0,2 TU		0,4 TU		0,8 TU		1,6 TU		3,2 TU	
15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min
41	164	23	92								
41	164	25	100								
41	164	16	64								
40	160	19	76								
41	164	19	76								
39	156										
35	140										
41	164										
41	164										
42	168										
41	164										
44	176										
39	156										
37	148										
42	168										
41	164										
40	160										
41	164										
40	160										
41	164										

Tabelle 57: Mischung Vortest Analgetika nach dem modified toxic unit approach (koagulierte Embryonen, ohne Paracetamol).

Kontrolle		0,25 TU		0,5 TU		1 TU		2 TU		4 TU	
15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min	15sec	1min
40	160	7	28								
38	152	18	72								
34	136										
37	148										
38	152										
38	152										
39	156										
38	152										
40	160										
38	152										
39	156										
35	140										
35	140										
34	136										
36	144										
38	152										
33	132										
33	132										
36	144										
38	152										

Tabelle 58: Mischung Analgetika Haupttest (alle Endpunkte).

Kontrolle		1		2		3		4		5		6	
15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min
40	160	40	160	40	160	37	148	34	136	37	148	14	56
40	160	40	160	36	144	36	144	37	148	37	148	9	36
39	156	41	164	38	152	38	152	34	136	37	148	8	32
41	164	41	164	40	160	37	148	37	148	24	96	16	64
40	160	40	160	38	152	40	160	35	140	33	132	12	48
40	160	40	160	39	156	37	148	37	148	38	152	9	36
37	148	41	164	37	148	39	156	33	132	36	144	20	80
41	164	38	152	40	160	39	156	34	136	37	148		
38	152	38	152	37	148	40	160	38	152	26	104		
39	156	39	156	40	160	35	140	33	132	25	100		
40	160	40	160	39	156	39	156	36	144	36	144		
39	156	40	160	38	152	36	144	36	144	38	152		
40	160	41	164	35	140	38	152	39	156	36	144		
39	156	40	160	39	156	40	160	39	156	38	152		
38	152	34	136	37	148	39	156	32	128	35	140		
39	156	37	148	39	156	41	164	37	148	36	144		
40	160	40	160	34	136	38	152	40	160	34	136		
39	156	41	164	36	144	37	148	36	144	36	144		
37	148	39	156			37	148	39	156	35	140		
39	156							37	148				
39	156												
39	156												
41	164												
39	156												
40	160												
35	140												
41	164												
40	160												
40	160												
39	156												
40	160												
36	144												

Tabelle 59: Mischung Analgetika Haupttest (koagulierte Embryonen).

Kontrolle		1		2		3		4		5	
15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min
35	140	39	156	37	148	37	148	29	116	20	80
38	152	40	160	38	152	34	136	31	124	23	92
38	152	37	148	39	156	38	152	33	132		
37	148	35	140	40	160	36	144	37	148		
36	144	36	144	38	152	35	140	23	92		
37	148	37	148	36	144	36	144	28	112		
38	152	37	148	37	148	36	144	15	60		
39	156	38	152	40	160	35	140	33	132		
37	148	36	144	36	144	37	148	37	148		
38	152	36	144	39	156	38	152	24	96		
39	156	38	152	38	152	37	148	30	120		
40	160	37	148	39	156	37	148	30	120		
36	144	36	144	39	156	37	148	25	100		
39	156	36	144	39	156	37	148	29	116		
40	160	35	140	38	152	34	136	36	144		
40	160	37	148	38	152	39	156	34	136		
37	148	39	156	37	148	39	156	35	140		
38	152	40	160	35	140	38	152	39	156		
37	148	36	144	37	148	37	148	36	144		
39	156	33	132	40	160	40	160				
36	144										
39	156										
39	156										
40	160										
37	148										
38	152										
39	156										
39	156										
37	148										
34	136										
39	156										
39	156										
39	156										
39	156										
38	152										
40	160										

Tabelle 60: Mischung Analgetika Haupttest (koagulierte Embryonen, ohne Paracetamol).

Kontrolle		1		2	
15s	1min	15s	1min	15s	1min
37	148	33	132	18	72
39	156	33	132	19	76
35	140	33	132	5	20
39	156	36	144	15	60
38	152	36	144	8	32
36	144	29	116	5	20
40	160	33	132	9	36
39	156	35	140	32	128
38	152	29	116	17	68
41	164	28	112		
39	156	30	120		
41	164	29	116		
40	160	35	140		
38	152	31	124		
37	148	32	128		
38	152	29	116		
40	160	36	144		
41	164	34	136		
41	164	36	144		
40	160	25	100		
39	156				
37	148				
37	148				
39	156				

Tabelle 61: Mischung gemischte Stoffgruppe mit unähnlichen Wirkmechanismen.

Kontrolle		1		2		3		4		5		6	
15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min
42	168	40	160	41	164	40	160	37	148	36	144	9	36
43	172	41	164	40	160	40	160	38	152	36	144	10	40
40	160	41	164	41	164	40	160	39	156	39	156	18	72
42	168	42	168	42	168	38	152	38	152	36	144	18	72
41	164	35	140	41	164	41	164	36	144	37	148	13	52
38	152	41	164	39	156	35	140	31	124	37	148	28	112
39	156	41	164	42	168	40	160	35	140	37	148	13	52
39	156	40	160	42	168	34	136	39	156	38	152	14	56
36	144	39	156	37	148	38	152	40	160	39	156	36	144
36	144	39	156	40	160	35	140	38	152	39	156	12	48
39	156	40	160	40	160	37	148	35	140	37	156	36	144
39	156	40	160	38	152	37	148	40	160	40	148	16	64
38	152	42	168	39	156	35	140	40	160	39	160	35	140
39	156	39	156	38	152	40	160	35	140	40	156	15	60
39	156	40	160	40	160	40	160	35	140	40	160	16	64
39	156	41	164	41	164	36	144	36	144	40	160	26	104
39	156	39	156	40	160	35	140	39	156	39	156	10	40
40	160	41	164	40	160	39	156	38	152	40	160	7	28
40	160	41	164					38	152	38	152		
39	156							38	152	39	156		
40	160												
41	164												
39	156												
41	164												
41	164												
42	168												

Tabelle 62: Mischung Pflanzenschutzmittel.

Kontrolle	1		2		3		4		5		6		7		8		9		
	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	
41	164	40	160	41	164	39	156	40	160	41	164	36	144	33	132	30	120	22	88
40	160	40	160	39	156	39	156	41	164	38	152	38	152	35	140	23	92		
39	156	41	164	41	164	39	156	40	160	38	152	38	152	29	116	20	80		
40	160	42	168	41	164	37	148	41	164	38	152	39	156	28	112	23	92		
35	140	40	160	39	156	41	164	42	168	38	152	35	140	36	144	21	84		
40	160	40	160	40	160	40	160	37	148	38	152	31	124	35	140	25	100		
29	116	41	164	41	164	39	156	19	76	37	148	36	144	29	116	15	80		
40	160	41	164	41	164	37	148	41	164	39	156	40	160	33	132				
39	156	40	160	39	156	39	156	40	160	40	160	39	156	35	140				
40	160	40	160	40	160	39	156	36	144	39	156	36	144	21	84				
39	156	41	164	41	164	40	160	39	156	40	160	36	144	31	124				
40	160	41	164	41	164	38	152	39	156	36	144	35	140	34	136				
36	144	41	164	41	164	39	156	40	160	37	148	39	156	12	48				
39	156	41	164	41	164	37	148	39	156	39	156	36	144	28	112				
39	156	40	160	41	164	40	160	38	152	36	144	33	132	33	132				
40	160	42	168	41	164	40	160	40	160	38	152	30	120	35	140				
39	156	42	168	41	164	40	160	38	152	41	164	37	148	33	132				
40	160	39	156	41	164	40	160	40	160	35	140	38	152	31	124				
36	144	40	160	41	164	41	164	40	160	41	164	40	160						
39	156									38	152								
38	152																		
39	156																		
41	164																		
40	160																		
39	156																		
40	160																		
38	152																		
40	160																		
38	152																		
39	156																		
40	160																		
40	160																		
41	164																		
40	160																		
41	164																		
41	164																		

Tabelle 63: Mischung auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe (unähnliche Wirkmechanismen).

Kontrolle		1		2		3		4		5		6	
15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min
42	168	39	156	37	148	33	132	39	156	25	100	13	52
40	160	40	160	39	156	36	144	35	140	21	84	14	56
41	164	41	164	38	152	35	140	34	136	20	80	15	60
40	160	40	160	39	156	35	140	35	140	10	40	24	96
45	180	39	156	40	160	37	148	39	156	23	92	25	100
38	152	40	160	39	156	33	132	36	144	30	120	23	92
40	160	39	156	40	160	35	140	35	140	30	120	17	68
40	160	37	148	39	156	41	164	36	144	19	76	26	104
40	160	39	156	26	104	36	144	35	140	28	112	23	92
38	152	38	152	38	152	18	72	38	152	23	92	25	100
37	148	36	144	39	156	36	144	37	148	25	100		
41	164	35	140	38	152	35	140	27	108	32	128		
40	160	41	164	36	144	39	156	35	140	30	120		
37	148	37	148	37	148	38	152	35	140	31	124		
38	152	38	152	37	148	37	148	34	136	16	64		
40	160	37	148	37	148	37	148	32	128	25	100		
41	164	35	140	38	152	36	144	36	144	33	132		
36	144	38	152	38	152	39	156	35	140	25	100		
37	148	35	140	35	140	36	144	37	148	30	120		
36	144	37	148	34	136			38	152				
37	148												
38	152												
38	152												
37	148												
37	148												
37	148												
40	160												
40	160												
40	16												
35	140												
38	152												
38	152												
40	160												
36	144												
36	144												
37	148												
41	164												
38	152												
38	152												
39	156												
40	160												
40	160												

Tabelle 64: Mischung auf Basis der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe (unähnliche Wirkmechanismen).

Kontrolle		1		2		3		4		5		6	
15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min
37	148	40	160	38	152	37	148	37	148	31	124	8	32
40	160	40	160	37	148	15	60	39	156	24	96		
40	160	40	160	36	144	39	156	36	144	13	52		
39	156	39	156	39	156	36	144	38	152	19	76		
40	160	40	160	38	152	39	156	39	156	13	52		
41	164	38	152	38	152	38	152	34	136	7	28		
41	164	39	156	39	156	39	156	38	152	13	52		
37	148	39	156	35	140	38	152	39	156	31	124		
38	152	40	160	40	160	39	156	30	120	17	68		
39	156	38	152	39	156	41	164	39	156	23	92		
39	156	40	160	38	152	34	136	35	140	28	112		
37	148	36	144	37	148	36	144	37	148	24	96		
39	156	39	156	39	156	41	164	34	136	14	56		
40	160	39	156	39	156	39	156	40	160	19	76		
37	148	38	152	41	164	36	144	39	156	31	124		
38	152	41	164	40	160	37	148	38	152				
39	156	37	148	36	144	34	136	36	144				
37	148	37	148	39	156	34	136	35	140				
37	148			40	160			35	140				
37	148			40	160			36	144				
39	156												
40	160												
40	160												
40	160												
40	160												
40	160												
40	160												
40	160												
41	164												
40	160												
37	148												
37	148												
40	160												
38	152												

Tabelle 65: Mischung auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe (partiell ähnliche Wirkmechanismen).

Kontrolle	
15s	1min
40	160
41	164
40	160
41	164
41	164
42	168
44	176
41	164
40	160
40	160
40	160
40	160
40	160
41	164
40	160
40	160
40	160
40	160
41	164
40	160

Tabelle 66: Mischung auf Basis der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe (partiell ähnliche Wirkmechanismen).

Kontrolle		1		2		3		4		5	
15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min	15s	1min
41	164	40	160	41	164	21	84	37	148	28	112
41	164	38	152	41	164	38	152	29	116	23	92
41	164	41	164	39	156	39	156	35	140	24	96
44	176	44	176	40	160	39	156	26	104	23	92
40	160	41	164	40	160	33	132	39	156	27	108
40	160	39	156	40	160	39	156	38	152	22	88
40	160	40	160	40	160	37	148	34	136	28	112
43	172	40	160	41	164	38	152	34	136	26	104
40	160	44	176	41	164	40	160	38	152	25	100
39	156	41	164	40	160	40	160	35	140	29	116
41	164	43	172	39	156	39	156	34	136	18	72
40	160	43	172	40	160	40	160	31	124	29	116
40	160	41	164	40	160	41	164	31	124	21	84
40	160	40	160	42	168	40	160	33	132	20	80
40	160	42	168	39	156	40	160	35	140	28	112
39	156	41	164			41	164	36	144	26	104
40	160	40	160			40	160	40	160	29	116
38	152	39	156					34	136	23	92
40	160	40	160					36	144		
41	164	41	164					33	132		
39	156										
40	160										
41	164										
41	164										
41	164										
41	164										
40	160										
41	164										
41	164										
40	160										
41	164										
43	172										
43	172										
42	168										
42	168										
41	164										

Tabelle 67: Mischung auf Basis der NOEC.

Kontrolle	
15s	1min
41	164
40	160
41	164
40	160
40	160
40	160
41	164
42	168
42	168
41	164
45	180
42	168
41	164
41	164
44	176
45	180
44	176
44	176
43	172
40	160
45	180
41	164
43	172

Anhang C: gemessene Parameter für Einzelstoffe und Mischungen.

Tabelle 1: Substanz: Acetylcystein (ohne pH-Einstellung).

Zeitpunkt t = 0 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	88,6	24,2	181	24,7	7,01	24,7
31,25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,52	23,7
62,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,84	23,8
125,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,53	23,0
250,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,30	21,3
500,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,11	19,0

Zeitpunkt t = 48 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	92,9	24,5	253	24,7	6,3	24,7
31,25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,33	25,2
62,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,98	25,9
125,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,59	26,0
250,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,33	26,0
500,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,12	25,8

Tabelle 2: Substanz: Acetylcystein (mit pH-Einstellung).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	92,8	23,3	151	22,6	6,4	22,6
1500	91,4	23,4	397	22,0	6,08	22,0
3000	90,6	23,2	650	21,9	7,44	21,9
6000	91,7	23,1	1140	21,2	8,03	21,2
12000	91,3	23,1	2030	20,1	8,11	20,1
24000	91,6	22,8	3690	16,9	8,14	16,9

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	91,2	24,5	149	24,2	6,54	24,2
1500	86,7	24,7	404	24,4	6,13	24,4
3000	87,4	24,5	661	24,7	6,61	24,7
6000	86,6	24,4	1166	24,9	7,06	24,9
12000	88,3	24,4	2120	25,0	7,60	25,0
24000	81,3	24,3	3880	24,7	7,76	24,7

Tabelle 3: Substanz: Acetylsalicylsäure.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	63,8	17,7	n.b.	n.b.	8,65	20°C
27,92	58,1	17,3	n.b.	n.b.	6,41	20°C
39,09	62,6	17,0	n.b.	n.b.	6,40	20°C
54,72	62	17,2	n.b.	n.b.	5,15	20°C
76,61	62,6	17,4	n.b.	n.b.	4,08	20°C
107,26	62,2	17,5	n.b.	n.b.	3,96	20°C

Tabelle 4: Substanz: Atropin.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	96,7	18,9	149	19,8	7,69	19,8
4500	94,3	19,1	1162	19,0	7,60	19,0
6750	93,6	19,0	1629	18,4	7,34	18,4
10125	92,8	18,9	2230	16,2	7,16	16,2
15187,5	94,2	18,7	3150	15,9	7,08	15,9
22781,25	92,5	18,0	4360	14,3	6,92	14,3

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	n.b.	n.b.	156	18,7	7,04	18,7
4500	n.b.	n.b.	871	19,7	7,46	19,7
6750	n.b.	n.b.	1693	21,0	7,22	21,0
10125	n.b.	n.b.	2360	21,5	7,08	21,5
15187,5	n.b.	n.b.	3310	21,7	6,87	21,7
22781,25	n.b.	n.b.	4560	21,0	6,61	21,0

Tabelle 5: Substanz: Bezafibrat (Wellplatte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	93,0	22,7	182	21,9	6,82	21,9
6,25	89,0	22,6	147	21,7	6,91	21,7
12,5	90,4	22,5	149	21,8	6,93	21,8
25,0	89,2	22,4	150	21,8	6,87	21,8
50,0	89,1	22,4	152	21,9	6,70	21,9
100,0	87,5	22,4	159	21,9	5,88	21,9

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	89,4	23,2	154	22,9	6,90	22,9
6,25	84,5	23,1	1031	23,9	6,44	23,9
12,5	82,3	23,0	159	24,0	6,77	24,0
25,0	83,1	23,0	154	24,00	6,74	24,0
50,0	83,3	22,9	157	24,0	6,71	24,0
100,0	83,4	23,0	163	23,7	6,31	23,7

Tabelle 6: Substanz: Bezafibrat (Glas).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	95,0	20,3	147	20,7	6,62	20,7
6,25	92,8	20,3	219	20,3	6,30	20,3
12,5	93,6	20,5	154	20,5	6,55	20,5
25,0	92,0	20,5	151	20,6	6,58	20,6
50,0	92,6	20,5	153	20,8	6,54	20,8
100,0	91,9	20,5	159	21,3	5,94	21,3

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	88,6	20,9	158	21,0	6,87	21,0
6,25	89,5	21	770	20,6	6,31	20,6
12,5	88,6	20,8	171	21,0	6,63	21,0
25,0	89,9	20,7	162	21,1	6,69	21,1
50,0	90,3	20,5	165	20,6	6,71	20,6
100,0	93,8	20,9	164	20,1	6,64	20,1

Tabelle 7: Substanz: Bisoprolol.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	91,6	24,2	262	24,7	6,83	24,7
8000	86,8	24,1	1115	23,9	6,86	23,9
10059,5	86,0	24,1	1380	23,4	6,91	23,4
12649,1	85,6	24,1	1644	23,0	6,87	23,0
15905,4	87,2	24,1	1627	22,5	6,87	22,5
20000,0	85,9	23,9	2600	22,0	6,90	22,0

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,3	24,5	160	25,0	6,84	25,0
8000	84,4	24,7	1332	25,6	6,77	25,6
10059,5	84,1	24,5	1626	25,7	6,98	25,7
12649,1	82,5	24,6	2922	25,8	6,95	25,8
15905,4	85,8	24,5	2310	25,7	6,94	25,7
20000,0	84,6	24,6	2740	25,4	6,92	25,4

Tabelle 8: Substanz: Carbamazepin.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	93,0	22,7	182	21,9	6,82	21,9
12,5	88,4	22,5	149	21,8	7,02	21,8
25,0	87,8	22,5	149	21,7	7,07	21,7
50,0	88,0	22,5	151	21,7	7,08	21,7
100,0	87,2	22,4	156	21,6	7,08	21,6
200,0	87,1	22,4	161	21,3	7,04	21,3

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	89,4	23,2	154	22,9	6,90	22,9
12,5	82,8	22,9	155	24,2	6,57	24,2
25,0	83,3	22,9	153	24,2	6,70	24,2
50,0	83,7	22,9	156	24,0	6,75	24,0
100,0	84,3	22,8	160	23,8	6,82	23,8
200,0	85,3	22,8	166	23,7	6,80	23,7

Tabelle 9: Substanz: Carbaryl.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	106	21,7	0,2	22,5	8,37	20
2,2	89,9	19,4	0,2	19,2	7,56	20
3,28	91,2	19,3	0,2	19,3	7,55	20
4,9	96	19,2	0,2	19,4	7,5	20
7,31	93,4	19,2	0,2	19,5	7,53	20
10,9	93,3	19,1	0,2	19,4	7,53	20

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	6,3	22,2	0,2	22	8,25	20
2,2	8,3	20,6	0,2	20,6	7,28	20
3,28	6	21,2	0,2	21	7,29	20
4,9	6,6	21,2	0,2	21,1	7,34	20
7,31	6,2	21,1	0,2	21,1	7,26	20
10,9	6,8	20,6	0,2	20,8	7,19	20

Tabelle 10: Substanz: Chloramhenicol.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	80,1	22,5	258	23,8	7,36	23,8
1111,11	80,4	22,2	153	23,5	7,42	23,5
1666,67	81,0	22,1	154	23,3	7,30	23,3
2500	80,4	22,0	155	23,0	7,20	23,0
3750	79,4	21,9	155	22,5	7,08	22,5
5625	78,4	21,8	157	21,6	6,91	21,6

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	97,7	21,6	163	25,3	7,19 _o	25,3
1111,11	96,7	22,5	476	23,7	7,19	23,7
1666,67	94,7	23,4	173	25,3	7,23	25,3
2500	95,1	24,0	177	25,9	7,1	25,9
3750	96,0	24,3	169	26,3	6,95	26,3
5625	97,1	24,7	171	26,2	6,99	26,2

Tabelle 11: Substanz: Clarithromycin.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	88,7	23,4	186	25,6	7,25	25,6
0,63	84,0	23,0	146	24,9	7,34	24,9
1,3	84,8	23,0	146	24,4	7,30	24,4
2,5	84,3	22,9	146	23,2	7,28	23,2
5,0	82,9	22,8	145	21,1	7,30	21,1
10,0	84,5	22,6	146	16,9	7,40	16,9

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	89,1	22,8	143	24,1	6,95	24,1
0,63	82,9	22,8	149	25,3	6,82	25,3
1,3	83,1	22,8	151	25,5	6,82	25,5
2,5	83,8	23,0	153	25,8	6,85	25,8
5,0	84,2	23,1	156	25,8	6,83	25,8
10,0	82,5	23,2	155	25,3	6,84	25,3

Tabelle 12: Substanz: Clenbuterol.

Zeitpunkt t = 0 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,9	20,8	150	21,0	7,31	21,0
1350	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
2025	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
3037,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
4556,25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
6834,38	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Zeitpunkt t = 48 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,5	21,0	154	21,5	9,98	21,5
1350	91,3	21,0	615	22,9	10,12	22,9
2025	89,5	21,0	745	23,3	10,18	23,3
3037,5	85,7	21,0	991	23,4	10,17	23,4
4556,25	88,5	21,0	1430	23,6	10,53	23,6
6834,38	88,3	21,0	2030	2,1	1,65	22,1

Tabelle 13: Substanz: Clofibrinsäure (ohne pH-Einstellung).

Zeitpunkt t = 0 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	92	26,8	276	27,0	7,01	27,0
28,13	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	5,38	25,5
56,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,39	25,8
112,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,80	25,1
225,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,50	23,6
450,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,27	21,2

Zeitpunkt t = 48 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	6,57	25,6
28,13	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	5,43	26,7
56,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,61	26,7
112,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,89	26,6
225,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,54	26,5
450,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,28	26,3

Tabelle 14: Substanz: Clofibrinsäure (mit pH-Einstellung).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	88,6	24,2	181	24,7	7,01	24,7
37,5	86,6	24,1	170	24,5	7,13	24,5
75,0	87,7	24,1	195	24,1	7,16	24,1
150,0	88,4	24,0	241	23,0	7,19	23,0
300,0	91,1	24,0	328	21,0	7,24	21,0
600,0	95,5	23,7	501	17,5	7,33	17,5

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	92,9	24,	153	24,7	6,30	24,7
37,5	86,4	24,4	399	25,6	6,90	25,6
75,0	85,0	24,2	199	26,0	6,99	26,9
150,0	84,9	24,3	249	26,2	6,98	26,2
300,0	86,0	24,1	344	26,3	6,96	26,3
600,0	85,4	24,1	529	25,9	7,05	25,9

Tabelle 15: Substanz: Coffein.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	82,6	24,9	145	25,7	6,69	25,7
500	67,9	23,2	146	23,1	6,98	23,1
700	68,5	22,9	145	23,0	7,02	23,0
1125	71,2	22,5	145	22,5	7,00	22,5
1687,5	71,6	22,1	144	22,0	7,03	22,0
2531,25	71,0	21,6	145	21,4	7,03	21,4

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	65,3	24,5	149	24,6	7,53	24,6
500	86,3	24,9	153	25,1	7,65	25,1
700	82,2	25,6	150	26,0	7,62	26,0
1125	71,4	25,6	150	26,0	7,66	26,0
1687,5	69,2	25,5	149	25,7	7,65	25,7
2531,25	70,2	25,3	150	25,5	7,62	25,5

Tabelle 16: Substanz: Cyclophosphamid.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,0	20,2	204	19,3	7,08	19,3
1000,0	93,4	19,8	152	19,5	7,16	19,5
2000,0	90,4	19,8	155	19,5	7,05	19,5
4000,0	90,8	19,8	169	19,4	6,72	19,4
8000,0	88,4	19,8	194	19,5	6,08	19,5
16000,0	91,8	19,8	251	19,9	4,50	19,9

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	89,9	16,8	159	20,9	6,61	20,9
1000,0	86,6	17,1	204	20,8	3,99	20,8
2000,0	85,0	17,0	261	20,7	3,57	20,7
4000,0	86,1	17,7	502	21,1	3,20	21,1
8000,0	84,8	18,2	607	21,6	3,10	21,6
16000,0	84,5	18,3	879	21,5	2,98	21,5

Tabelle 17: Substanz: Diclofenac (alle Endpunkte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	80,1	21,5	145	21,2	6,89	21,2
0,89	70,4	20,9	147	20,3	5,87	20,3
2,05	68,1	20,9	147	20,4	5,89	20,4
4,73	68,0	20,8	147	20,5	5,90	20,5
10,87	68,4	20,6	148	20,3	5,94	20,3
25	71,1	20,2	150	20,1	6,00	20,1

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	69,5	22,3	150	22,4	7,99	22,4
0,89	85,7	23,4	155	22,2	7,70	22,2
2,05	71,3	23,8	148	22,3	7,68	22,3
4,73	68,5	23,9	149	22,5	7,71	22,5
10,87	71,1	23,8	151	22,5	7,65	22,5
25	72,9	22,5	152	22,2	7,66	22,2

Tabelle 18: Substanz: Diclofenac (koagulierte Embryonen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	80	24,3	144	24,8	5,40	24,8
25	71,9	23,4	150	23,5	6,10	23,5
37,5	67,9	23,3	152	23,3	6,21	23,3
56,25	68,2	23,2	156	23,1	6,30	23,1
84,38	69,3	22,9	162	22,8	6,32	22,8
126,56	73,2	22,5	171	22,4	6,37	22,4

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	70,5	25,1	148	24,8	5,4	24,8
25	77,3	24,8	158	23,5	6,1	23,5
37,5	74,7	24,8	155	23,2	6,2	23,2
56,25	72,1	24,8	159	23,1	6,3	23,1
84,38	73,8	25,0	166	22,8	6,32	22,8
126,56	65,1	25,0	175	22,4	6,37	22,4

Tabelle 19: Substanz: Erytromycin.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	88,7	23,4	186	25,6	7,25	25,6
0,63	86,4	24,2	142	22,8	7,12	22,8
1,3	85,2	24,0	143	23,2	7,19	23,2
2,5	85,7	23,8	144	22,6	7,22	22,6
5,0	87,2	23,2	143	21,1	7,26	21,1
10,0	85,6	16,0	142	18,7	7,31	18,7

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	89,1	22,8	143	24,0	6,95	24,0
0,63	82,1	22,7	224	24,1	6,61	24,1
1,3	82,9	22,7	150	24,7	6,68	24,7
2,5	82,2	22,7	149	25,0	6,70	25,0
5,0	81,9	22,7	150	25,2	6,73	25,2
10,0	83,2	22,7	156	25,4	6,82	25,4

Tabelle 20: Substanz: EE₂ (Wellplatte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	88,6	24,8	223	25,5	6,96	25,5
0,5625	87,6	24,9	147	26,0	6,83	26,0
1,1	88,0	24,9	148	26,0	6,92	26,0
2,3	88,3	24,7	146	25,9	6,99	25,9
4,5	89,4	24,8	146	25,7	7,02	25,7
9,0	98,2	24,2	146	25,5	7,01	25,5

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	84,5	23,8	154	24,0	6,69	24,0
0,5625	83,4	23,2	151	24,8	6,80	24,8
1,1	82,2	23,1	150	25,1	6,67	25,1
2,3	83,0	23,0	161	25,2	6,50	25,2
4,5	80,7	22,9	156	25,1	6,69	25,1
9,0	81,3	22,8	154	24,9	6,63	24,9

Tabelle 21: Substanz: EE₂ (Glas).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	93,1	20,7	247	21,1	6,93	21,1
0,5625	92,0	20,6	148	20,9	6,32	20,9
1,1	90,5	20,7	149	21,0	6,57	21,0
2,3	88,4	20,7	151	21,1	6,74	21,1
4,5	89,2	20,6	153	21,1	6,84	21,1
9,0	89,6	20,6	159	21,1	6,89	21,1

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	91,9	20,9	161	21,4	6,06	21,4
0,5625	88,0	20,8	343	21,4	6,67	21,4
2,3	86,1	20,8	165	22,1	6,93	22,1
4,5	86,3	20,8	168	22,2	6,97	22,2
9,0	85,7	20,8	170	22,1	7,07	22,1

Tabelle 22: Substanz: Fenofibrat (Wellplatte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	91,0	25,1	213	25,6	6,76	25,6
14,81	86,3	25,3	150	26,3	6,94	26,3
22,2	85,2	25,4	152	26,7	7,01	26,7
33,3	85,8	25,9	156	27,0	7,03	27,0
50,0	85,6	26,3	153	27,2	7,07	27,2
75,0	84,3	26,1	151	27,2	7,08	27,2

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	87,8	23,5	154	24,0	6,69	24,0
14,81	82,2	23,6	284	24,4	6,87	24,4
22,2	82,0	23,4	149	24,9	6,95	24,9
33,3	80,3	23,5	160	25,5	6,94	25,5
50,5	80,4	23,4	155	25,8	6,86	25,8
75,0	81,5	23,4	152	25,4	6,92	25,4

Tabelle 23: Substanz: Fenofibrat (Glas).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	96,2	22,0	206	22,8	6,75	22,8
14,81	91,0	22,3	149	22,8	7,01	22,8
22,2	91,5	22,3	149	23,3	7,02	23,3
33,3	90,6	22,4	148	23,7	7,02	23,7
50,0	91,5	22,8	148	24,3	7,04	24,3
75,0	90,0	23,0	148	24,8	7,01	24,8

Zeitpunkt t = 48(n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
14,81	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
22,2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
33,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
50,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
75,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 24: Substanz: Ibuprofen (alle Endpunkte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle)	80,4	18,4	153	18,5	8,32	18,5
5,41	73,2	19,4	145	18,1	8,31	18,1
10,81	68,7	19,5	146	18,3	8,31	18,3
21,63	67,2	19,4	149	18,2	8,50	18,2
43,25	68,9	19,2	154	18,2	8,54	18,2
86,5	69,0	18,8	164	18,9	8,27	18,0

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	64,8	20,2	146	20,5	6,71	20,5
5,41	77,3	21,4	155	19,9	6,58	19,9
10,81	69,4	21,8	148	19,9	6,53	19,9
21,63	66,6	21,6	151	19,9	6,53	19,9
43,25	65,0	21,5	158	20,1	6,20	20,1
86,5	65,7	21,0	169	20,0	6,52	20,0

Tabelle 25: Substanz: Ibuprofen (koagulierte Embryonen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	85,1	24,9	146	24,7	5,29	24,7
8,12	76,6	22,8	149	22,9	6,57	22,9
16,23	70,6	22,6	150	22,9	6,52	22,9
32,46	68,8	22,6	153	22,8	6,47	22,8
64,92	67,8	22,5	161	22,6	6,45	22,6
129,84	72,4	22,3	177	22,1	6,33	22,1

Zeitpunkt t = 48 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	70,5	25,1	148	25,1	7,72	25,1
8,12	74,5	25,1	152	25,1	7,53	25,1
16,23	68,8	25,6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
32,46	67,7	25,7	155	25,6	7,68	25,6
64,92	68,5	25,6	166	25,7	7,71	25,7
129,84	65,7	25,2	181	25,3	7,72	25,3

Tabelle 26: Substanz: Ifosfamid.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	95,7	22,8	218	23,8	7,13	23,8
1250,0	94,8	22,8	150	23,8	7,29	23,8
2500,00	94,5	22,8	150	23,7	7,29	23,7
5000,0	93,7	22,7	146	23,7	7,27	23,7
10000,0	92,1	22,7	147	23,6	7,14	23,6
20000,0	94,3	22,6	151	23,3	7,02	23,3

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	95,2	25,3	159	25,8	6,70	23,8
1250,0	91,2	25,2	327	26,4	6,69	26,4
2500,0	91,4	25,1	161	26,7	6,78	26,7
5000,0	91,3	25,2	164	27,1	6,47	27,1
10000,0	91,4	25,2	174	27,1	6,09	27,1
20000,0	91,8	25,2	189	26,5	5,60	26,5

Tabelle 27: Substanz: Malathion.

Zeitpunkt t = 0 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	75,4	19,9	145	21,7	6,52	21,7
3	77,3	19,8	146	20,8	6,41	20,8
6	75,3	19,4	146	20,6	6,39	20,6
12	74,9	19,3	147	20,5	6,52	20,5
24	76,3	19,3	148	20,4	6,62	20,4
48	76,0	19,3	150	20,1	6,66	20,1
96	n.b.	n.b.	156	19,7	6,63	19,7

Tabelle 28: Substanz: Metoprolol.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	82,1	20,7	144	21,4	6,92	21,4
1500	85,5	20,6	401	20,1	7,52	20,1
2250	85,9	20,4	535	19,3	7,61	19,3
3375	85,3	20,1	725	18,2	7,79	18,2
5062,5	86,1	19,8	1003	16,6	8,15	16,6
7593,75	84,2	19,4	1395	14,7	8,55	24,7

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	86,1	21,4	151	21,7	6,64	21,7
1500	87,7	21,4	418	22,6	6,50	22,6
2250	87,3	21,4	553	23,3	6,59	23,3
3375	88,6	21,5	764	23,4	6,60	23,4
5062,5	87,8	21,5	1051	23,7	6,58	23,7
793,75	88,7	21,8	1449	23,1	6,61	23,1

Tabelle 29: Substanz: Naproxen (alle Endpunkt).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	68,3	18,6	144	18,8	5,90	18,8
10,16	72,4	18,8	148	19,0	5,82	19,0
20,32	67,2	19,1	151	19,0	5,78	19,0
40,63	69,6	19,5	156	19,0	5,74	19,0
81,26	70,6	19,1	166	18,6	5,79	18,6
162,52	71,6	18,4	188	18,1	5,80	18,1

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	66,8	18,7	152	18,8	9,04	18,8
10,16	74,8	20,9	160	18,5	8,80	18,5
20,32	70,6	21,1	153	18,7	8,73	18,7
40,63	68,0	21,1	159	18,9	8,69	18,9
81,26	67,1	20,8	171	19,1	8,64	19,1
162,52	69,1	19,9	193	18,7	8,72	18,7

Tabelle 30: Substanz: Naproxen (koagulierte Embryonen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	84,6	24,8	144	24,8	7,57	24,8
27,09	67,0	22,8	152	23,0	7,40	23,0
40,63	70,1	22,9	155	23,2	7,39	23,2
60,95	67,4	23,0	160	23,1	7,37	23,1
91,42	70,1	22,9	169	22,9	7,38	22,9
137,13	68,7	22,8	181	22,8	7,36	22,8

Tabelle 31: Substanz: Oxytetracyclin (ohne pH-Einstellung).

Zeitpunkt t = 0 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/l]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	82,4	23,3	196	23,5	7,56	23,5
75	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	6,17	23,4
150,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,17	23,0
300,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,55	22,1
600,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,23	20,4
1200,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,00	17,5

Zeitpunkt = 48 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	82,0	22,2	180	24,3	6,8	24,3
75	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	6,4	24,2
150,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,25	25,5
300,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,58	25,7
600,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,23	25,8
1200,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,97	26,0

Tabelle 32: Substanz: Oxytetracyclin (mit pH-Einstellung)

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle; 1:5)	88,6	24,8	223	25,5	6,96	25,5
250	86,6	24,5	197	25,4	6,77	25,4
500,0	84,9	24,4	244	25,1	6,63	25,1
1000,0	83,0	25,4	351	24,2	6,58	24,4
2000,2	84,3	24,5	573	22,4	6,89	22,4
4000,0	83,2	24,5	1033	20,2	7,20	20,2

Zeitpunkt = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [m/l]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	87,8	23,7	154	24,0	6,69	24,0
250	81,4	22,8	172	25,2	6,93	25,5
500,0	81,6	22,7	260	25,3	6,96	25,3
1000,0	82,5	22,6	382	25,1	6,82	25,1
2000,0	81,7	22,6	690	25,2	6,79	25,2
4000,0	7u2,2	22,5	1294	24,8	6,70	24,8

Tabelle 33: Substanz: Paracetamol (alle Endpunkte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	83,6	21,8	149	21,2	5,04	21,2
71,83	74,4	21,1	146	20,2	4,23	20,2
165,2	71,6	20,9	145	20,2	4,20	20,2
380	73,4	20,7	144	20,0	4,34	20,0
874	76,2	19,8	142	19,5	4,42	19,5
2010,2	72,6	17,3	139	18,0	4,37	18,0

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	69,2	22,6	150	22,1	3,6	22,1
71,83	64,9	23,4	148	22,2	3,64	22,2
165,2	63,8	23,5	148	22,2	3,72	22,2
380	64,3	23,8	146	22,5	3,73	22,5
874	68,8	23,9	147	22,7	3,74	22,7
2010,2	67,0	23,4	146	22,7	3,74	22,7

Tabelle 34: Substanz: Paracetamol (koagulierte Embryonen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	88,7	22,7	150	24,0	6,79	24,0
380	76,9	21,8	145	22,6	7,06	22,6
760	67,6	22,2	145	22,5	7,07	22,5
1520	66,2	22,3	145	22,4	7,08	22,4
3040	66,2	22,2	143	22,3	7,08	22,3
6080	72,3	22,0	142	22,0	7,08	22,0

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	65,3	24,5	149	24,6	7,53	24,6
380	69,0	25,2	148	25,4	7,61	25,4
760	70,2	25,3	147	25,6	7,61	25,6
1520	66,5	25,3	150	25,6	7,58	25,6
3040	64,2	25,2	149	25,1	7,55	25,1
6080	71,1	24,9	147	24,6	7,53	24,6

Tabelle 35: Substanz: Parathion.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [mS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	79,3	20,0	144	20,9	7,34	20,9
5	83,0	19,7	145	20,8	7,51	20,8
7,5	71,0	19,7	146	20,3	7,55	20,3
11,3	78,5	19,6	145	20,0	7,59	20,0
16,9	78,0	19,6	145	19,6	7,88	19,6
25,3	76,6	19,6	145	18i,9	7,91	18,9

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [mg/l]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [mS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	79,0	19,5	156	20,9	7,74	20,9
5	77,4	19,7	152	22,4	7,73	22,4
7,5	78,4	20,0	152	23,1	7,73	23,1
11,3	76,9	20,1	155	23,1	7,72	23,1
16,9	78,1	20,2	156	23,5	7,74	23,5
25,3	77,1	20,3	154	22,8	7,68	22,8

Tabelle 36: Substanz: Propranolol.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	80	17,9	148i	17,9	7,16	17,9
36,98	0,1	16,7	155	16,7	7,19	16,7
73,95	72,6	16,3	168	16,3	7,24	16,3
147,91	69,9	15,7	192	15,7	7,27	15,7
295,81	67,4	15,4	239	15,4	7,23	15,4
591,62	69	15	325	15,0	7,32	15

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [mg/l]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [mS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	63,7	19,0	147	19,7	8,45	19,7
36,98	59,2	23,7	177	21,3	8,00	21,3
73,95	49,6	23,5	189	21,5	7,95	21,5
147,91	55,5	23,3	203	21,5	7,86	21,5
295,81	51,5	22,8	250	21,5	7,9	21,5
591,62	60,4	22,2	328	21,3	7,91	21,3

Tabelle 37: Substanz: Roxithromycin (Wellplatte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,0	23,5	220	24,0	7,04	24,0
0,63	88,6	23,2	143	23,5	7,04	23,5
1,3	85,1	22,7	145	23,5	7,07	23,5
2,5	85,2	22,5	146	23,4	7,09	23,4
5,0	85,7	22,5	148	23,3	7,14	23,3
10,0	84,7	22,6	153	23,2	7,23	23,2

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [mg/l]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	88,2	26,2	148	27,1	7,00	27,1
0,63	86,9	26,1	202	26,9	6,69	26,9
1,3	84,0	25,9	149	27,0	6,74	27,0
2,5	84,6	25,6	148	27,1	6,77	27,1
5,0	84,9	25,4	150	27,3	6,75	27,3
10,0	85,1	25,2	154	27,3	6,74	27,3

Tabelle 38: Substanz: Roxithromycin (Glas).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	96,2	22,0	206	22,8	6,75	22,8
0,63	92,5	22,2	145	22,9	6,91	22,9
1,3	90,3	22,2	146	22,9	6,94	22,9
2,5	92,4	22,3	147	23,0	6,96	23,0
5,0	90,7	22,2	147	23,3	6,98	23,3
10,0	89,9	22,8	149	23,8	7,17	23,8

Tabelle 39: Substanz: Salbutamol.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur[°C]
Kontrolle	93,4	23,9	211	24,6	6,93	24,6
1250	91,6	24,1	508	24,7	6,91	24,7
2500,0	88,4	24,1	832	24,6	6,79	24,6
5000,0	88,2	24,0	1524	24,3	6,7	24,3
10000,0	87u,7	24,0	2600	23,5	6,59	23,5
20000,0	87,1	23,8	4610	21,5	6,49	21,5

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [mg/l]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,2	24,6	160	25,5	6,58	25,5
1250	86,2	24,8	513	26,3	6,75	26,3
2500,0	87,3	24,6	864	26,4	6,76	26,4
5000,0	86,5	24,8	1570	26,5	6,70	26,5
10000,0	85,5	24,6	2680	26,5	6,54	26,5
20000,0	84,6	24,8	4770	26,2	6,45	26,2

Tabelle 40: Substanz: Sulfamethoxazol.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	93,1	20,7	243	21,1	6,93	21,1
50	90,7	20,5	148	21,0	6,69	21,0
100	88,5	20,4	152	21,1	6,22	21,1
200	88,8	20,4	156	21,1	5,79	21,1
400	90,1	20,3	160	21,3	5,43	21,3
800	96,5	20,2	174	21,4	5,10	21,4

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [mg/l]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	91,9	20,9	161	21,4	6,06	21,4
50	85,9	20,8	119	22,4	6,73	22,4
100	85,3	20,7	153	22,6	6,22	22,6
200	85,9	20,8	159	22,8	5,66	22,8
400	86,4	20,6	160	22,7	5,37	22,7
800	85,5	20,7	168	22,2	5,01	22,2

Tabelle 41: Substanz: Tamoxifen (Glas).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	96,8	21,4	206	23,3	6,94	23,3
3,1	93,8	21,4	149	24,0	6,61	24,0
6,3	92,7	21,3	147	24,2	6,72	24,2
12,5	91,7	21,2	145	24,5	6,71	24,5
25,0	91,6	21,1	143	25,1	6,58	25,1
50,0	90,8	21,1	144	26,1	5,83	26,1

Tabelle 42: Substanz: Tamoxifen (Wellplatte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	95,0	20,3	14u7	20,7	6,62	20,7
3,1	91,5	20,5	150	20,4	7,01	20,4
6,3	92,0	20,4	149	20,4	7,01	20,4
12,5	91,6	20,4	148	20,5	6,96	20,5
25,0	92,4	2,3	143	20,7	6,70	20,7
50,0	90,7	20,3	141	21,0	6,80	21,0

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	88,6	20,9	158	21,0	6,87	21,0
3,1	88,6	20,0	156	22,3	6,69	22,3
6,3	87,6	20,0	155	22,3	6,68	22,3
12,5	88,2	19,9	156	22,3	6,80	22,3
25,0	89,1	20,1	157	22,2	6,69	22,2
50,0	87,9	20,2	152	21,7	6,56	21,7

Tabelle 43: Substanz: Terbutalin.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,5	24,7	157	24,4	6,50	24,4
12150	94,5	24,4	3150	23,7	6,18	23,7
13762,3	84,9	24,1	3580	22,0	6,10	22,0
15588,5	84,5	24,0	3940	20,8	6,02	20,8
17657,0	82,3	23,7	4330	19,8	5,95	19,8
20000,0	83,2	22,3	4800	19,0	5,91	19,0

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,0	24,4	152	25,2	6,38	25,2
12150	85,6	24,2	2830	25,5	6,12	25,0
13762,3	86,0	24,2	3640	25,5	6,06	25,5
15588,5	83,2	24,1	4060	25,7	5,98	25,7
17657,0	84,5	24,7	4450	26,1	5,92	26,1
20000,0	81,9	24,9	4860	26,0	5,88	26,0

Tabelle 44: Substanz: Theophyllin.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [%]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur[°C]
Kontrolle	83,6	21,8	149	21,2	5,04	21,2
257,53	80,3	20,3	149	20,0	6,01	20,0
592,31	75,2	20,3	146	20,3	5,89	20,3
1362,34	75,3	20,6	146	20,3	6,06	20,3
3133,39	75,5	21,4	145	21,5	6,11	21,5
7206,8	71,0	23,7	145	22,8	6,10	22,8

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [mS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	6,2	22,6	150	22,1	3,60	22,1
257,53	78,0	24,1	152	22,2	3,56	22,2
592,32	73,8	24,5	146	22,0	3,60	22,0
1362,34	72,8	24,7	145	22,1	3,66	22,1
3133,39	65,7	24,8	145	22,2	3,66	22,2
7206,8	71,1	23,8	142	22,2	3,69	22,2

Tabelle 45: Substanz: Trimethoprim.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	92,9	24,6	250	26,6	7,09	26,6
18,75	91,5	25,0	147	26,0	7,49	26,0
37,5	91,6	24,9	148	25,9	7,76	25,9
75,0	89,3	24,7	146	24,2	8,01	24,2
150,0	89,2	24,5	145	21,8	8,30	21,8
300,0	86,1	24,3	143	17,9	8,60	17,9

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [mg/l]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,4	26,4	153	27,0	7,33	27,0
18,75	88,9	26,4	234	27,0	6,99	27,0
37,5	88,8	26,5	175	27,9	7,17	27,9
75,0	87,5	26,8	182	28,1	7,16	28,1
150,0	86,8	26,7	169	28,2	7,35	28,2
300,0	88,4	26,8	178	27,7	7,64	27,7

Tabelle 46: Substanz: Valproinsäure.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	87,1	24,9	150	25,1	5,40	25,1
6,33	71,0	24,4	147	24,5	5,72	24,5
8,44	69,6	24,4	146	24,5	5,79	24,5
11,25	69,7	24,4	146	24,4	5,85	24,4
15	72,3	24,3	147	24,3	5,89	24,3
20	70,5	24,2	147	24,1	5,95	24,1

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	80,0	24,8	150	25,2	6,11	25,2
6,33	74,1	26	149	26,0	6,13	26,0
8,44	72,3	26,5	148	26,5	6,12	26,5
11,25	68,1	26,5	149	26,5	6,08	26,5
15	69,7	26,2	150	26,2	6,05	25,4
20	68,5	25,5	151	25,4	6,03	25,4

Tabelle 47: Substanz: Verapamil.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [%]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	82,9	28,6	148	28,5	5,50	28,5
118,52	76,6	24,8	158	25,2	6,01	25,2
177,78	69,2	24,6	177	24,7	5,90	24,7
266,67	67,3	24,3	192	24,5	5,83	24,5
400	69,5	24,0	216	23,7	5,76	23,7
600	72,6	23,5	250	23,1	5,74	23,1

t = 48

Konzentration [mg/l]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [%]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	65,0	25,7	150	25,7	6,83	25,7
118,52	68,5	26,0	169	26,0	6,89	26,0
177,78	73,0	25,9	124	25,9	6,92	25,9
266,67	71,9	25,8	175	26,0	6,97	26,0
400	72,4	25,7	220	26,3	7,13	26,3
600	8,2	25,3	254	26,3	7,31	26,3

Tabelle 48: Substanz: Mischung Analgetika (Versuch 1/Clevers design, alle Endpunkte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	81,5	21,1	149	21,1	6,14	21,1
LC5/5	78,4	21,0	149	21,1	7,62	21,1
LC10/5	70,3	21,3	149	21,2	7,75	21,2
LC20/5	68,1	21,2	149	21,2	7,88	21,2
LC50/5	67,0	21,0	151	21,0	7,84	21,0
LC70/5	68,5	21,0	152	21,0	7,28	21,0

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μ S/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	68,9	23,7	152	23,7	8,25	23,7
LC5/5	76,9	24,8	159	24,6	8,09	24,6
LC10/5	72,2	24,8	151	24,7	8,13	24,7
LC20/5	70,5	24,7	151	24,6	8,17	24,6
LC50/5	69,9	24,5	152	24,5	8,28	24,5
LC70/5	71,7	24,1	153	24,1	8,43	24,1

Tabelle 49: Substanz: Mischung Analgetika (Versuch 2/Cleuvers design, alle Endpunkte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μ S/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	81,5	21,1	149	21,1	6,14	21,1
LC5/5	78,4	21,0	149	21,1	7,62	21,1
LC10/5	70,3	21,3	149	21,2	7,75	21,2
LC20/5	68,1	21,2	149	21,2	7,88	21,2
LC50/5	67,0	21,0	151	21,0	7,84	21,0
LV70/56	68,5	21,0	152	21,0	7,28	21,0

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μ S/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	67,1	23,0	157	23,0	6,25	23,0
LC5/5	69,8	23,3	152	23,3	6,09	23,3
LC10/5	71,7	23,4,3	152	23,5	6,13	23,5
LC20/5	73,6	23,4	153	23,7	6,18	23,7
LC50/5	71,4	23,3	154	23,5	6,22	23,5
LC70/5	65,9	22,4	155	22,5	6,24	22,5

Tabelle 50: Substanz: Mischung Analgetika (Cleuvers design; nur koagulierte Embryonen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μ S/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	72,7	24,0	148	24,5	7,03	24,5
LC10/5	72,9	20,8	155	20,9	7,80	20,9
LC20/5	66,5	21,0	154	21,1	7,88	21,1
LC50/5	65,7	21,0	156	20,8	7,86	20,8
LC70/5	67,0	20,7	157	20,6	7,90	20,6
LC99/5	72,2	20,1	162	19,7	7,96	19,7

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μ S/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	66,5	22,4	153	22,4	6,93	22,4
LC10/5	75,8	25,2	162	24,7	6,18	24,7
LC20/5	71,3	25,6	156	25,2	5,97	25,2
LC50/5	67,8	24,9	159	24,9	6,13	24,9
LC70/5	69,1	24,4	160	24,3	6,67	24,3
LC99/5	67,4	23,8	167	23,7	6,94	23,7

Tabelle 51: Substanz: Mischung Analgetika (modified TU approach, alle Endpunkte).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	81,5	21,1	149	21,1	6,14	21,1
0,25 TU	79,9	21,1	149	21,4	6,36	21,4
0,5 TU	77,1	20,9	149	21,0	6,69	21,0
1 TU	75,4	20,7	151	20,6	6,86	20,6
2 TU	80,8	20,3	155	19,8	7,15	19,8
4 TU	69,2	20,1	164	19,8	7,14	19,8

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	67,1	23,0	157	23,0	6,25	23,0
0,25 TU	82,5	23,4	160	23,7	5,66	23,7
0,5 TU	79,5	23,6	153	23,9	5,79	23,9
1 TU	78,8	23,8	155	24,1	5,84	24,1
2 TU	73,3	23,8	161	23,9	5,91	23,9
4 TU	68,9	23,5	169	23,5	6,02	23,5

Tabelle 52: Substanz: Mischung Analgetika (modified TU approach, nur koagulierte Embryonen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	84,4	23,6	151	23,5	7,50	23,5
0,25 TU	65,3	21,6	151	21,8	7,79	21,8
0,5 TU	66,6	21,5	153	21,6	7,66	21,6
1 TU	69,4	21,2	156	21,1	7,75	21,1
2 TU	73,0	20,6	162	20,2	7,77	20,2
4 TU	73,6	17,9	19,2	7,80	19,2	20,0

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	66,5	22,4	153	22,4	6,93	22,4
0,25 TU	69,0	23,4	152	23,3	7,04	23,3
0,5 TU	66,7	23,9	155	23,7	6,96	23,7
1 TU	65,8	23,8	159	23,5	6,93	23,5
2 TU	63,9	23,6	168	23,4	6,94	23,4
4 TU	65,9	23,6	172	23,4	6,95	23,4

Tabelle 53: Substanz: Mix Analgetika (modified toxic unit approach, ohne Paracetamol).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	91,5	20,3	148	20,5	4,40	20,5
0,2 Tu	80,3	20,4	146	20,3	4,35	20,3
0,4 TU	83,0	20,5	148	20,3	4,44	20,3
0,8 TU	84,0	20,5	151	20,2	4,45	20,2
1,6 TU	83,0	20,5	159	20,1	4,56	20,1
3,2 TU	84,4	20,5	177	19,9	4,54	19,9

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	84,0	21,1	149	20,9	8,12	20,9
0,2 TU	82,7	20,9	150	22,6	8,25	22,6
0,4 TU	81,0	21,0	152	22,5	8,28	22,5
0,8 TU	79,3	21,0	158	22,5	8,14	22,5
1,6 TU	80,6	21,0	164	22,3	8,02	22,3
3,2 TU	80,8	21,2	180	21,6	7,98	21,6

Tabelle 54: Substanz: Mix Analgetika (modified toxic unit approach, ohne Paracetamol).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	85,1	21,0	149	20,9	5,87	20,9
0,25 TU	77,9	19,4	151	19,2	5,57	19,2
0,5 TU	72,6	18,8	153	18,9	5,53	18,9
1 TU	72,1	18,8	157	18,8	5,49	18,8
2 TU	70,0	18,3	167	18,4	5,43	18,4
4 TU	77,1	18,4	188	18,3	5,47	18,3

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	90,0	21,1	153	21,1	8,59	21,1
0,25 TU	91,4	20,8	155	22,6	8,67	22,6
0,5 TU	83,23	20,8	157	22,8	8,69	22,8
1 TU	84,7	20,7	161	22,9	8,67	22,9
2 TU	83,1	20,6	172	22,7	8,64	22,7
4 TU	85,3	20,5	193	22,0	8,64	22,0

Tabelle 55: Substanz: Mix Analgetika (Haupttest; aEP).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	97,4	18,1	154	21,6	6,91	21,6
1	93,0	18,1	152	21,3	6,75	21,3
2	93,3	18,4	152	21,2	6,77	21,1
3	94,7	18,6	152	21,2	6,77	21,2
4	94,0	18,8	150	21,2	6,75	21,2
5	94,5	18,9	151	21,2	6,66	21,2
6	94,5	19,0	154	21,1	6,44	21,1
7	95,8	19,0	158	20,7	5,43	20,7
8	98,7	19,0	174	19,5	4,37	19,5

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	95,3	20,7	162	22,5	6,71	22,5
1	90,9	20,6	311	22,0	6,47	22,0
2	91,3	20,6	161	22,6	6,58	22,6
3	90,9	20,5	157	22,9	6,64	22,9
4	90,1	20,5	156	23,1	6,66	23,1
5	90,6	20,5	157	23,5	6,66	23,5
6	90,2	20,7	160	23,8	6,47	23,8
7	90,0	21,1	163	23,6	5,86	23,6
8	90,5	21,7	187	22,3	4,31	22,3

Tabelle 56: Substanz: Mix Analgetika (Haupttest, koa).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	95,5	21,3	185	20,9	6,95	20,9
1	94,2	21,3	149	20,8	7,10	20,8
2	92,2	21,3	149	20,8	7,13	20,8
3	93,4	21,2	150	20,9	7,14	20,9
4	92,5	21,1	151	20,9	7,14	20,9
5	92,5	21,0	151	20,9	7,12	20,9
6	93,6	21,0	153	21,0	7,02	21,0
7	93,2	20,9	157	21,2	6,78	21,2
8	92,4	20,9	168	21,4	6,20	21,4
9	92,8	20,8	190	21,9	5,10	21,9

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	94,5	21,2	161	22,9	6,55	22,9
1	89,2	20,9	293	22,3	6,42	22,3
2	90,3	20,8	156	23,1	6,75	23,1
3	91,3	20,8	155	23,8	6,84	23,8
4	90,5	20,8	155	24,2	6,87	24,2
5	90,4	20,6	158	24,5	6,86	24,5
6	90,3	20,6	162	24,7	6,83	24,7
7	93,0	20,5	167	24,7	6,64	24,7
8	90,3	20,4	174	24,5	6,23	24,5
9	94,9	20,4	192	23,5	5,36	23,5

Tabelle 57: Substanz: Mix Analgetika (Haupttest, koa, ohne Paracetamol).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	94,6	21,0	150	21,6	6,67	21,6
1	92,5	20,9	149	21,4	6,79	21,4
2	91,7	20,8	150	21,4	6,75	21,4
3	91,5	20,7	152	21,4	6,65	21,4
4	90,7	20,6	156	21,3	6,43	21,3
5	91,4	20,6	163	21,2	5,77	21,2
6	91,5	20,5	184	20,8	4,72	20,8

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	96,7	21,9	161	22,9	6,50	22,9
1	92,3	21,9	370	23,1	6,49	23,1
2	90,9	21,8	157	23,6	6,66	23,6
3	90,7	21,7	159	23,9	6,60	23,9
4	88,5	21,6	165	24,0	6,50	24,0
5	88,9	21,6	172	24,0	6,11	24,0
6	89,7	21,6	191	23,4	5,23	23,4

Tabelle 58: Mix gemischte Stoffgruppe mit unähnlichen Wirkmechanismen.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	93,7	22,0	212	21,9	6,71	21,9
1	92,2	21,9	149	22,1	6,83	22,1
2	91,8	21,9	149	22,2	6,85	22,2
3	91,0	21,8	150	22,2	6,87	22,2
4	90,7	21,7	150	21,8	6,87	21,8
5	92,2	21,7	154	21,9	6,86	21,9
6	91,4	21,6	160	22,0	6,83	22,0
7	91,4	21,6	171	22,0	6,75	22,0
8	92,4	21,6	195	21,9	6,55	21,9

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	89,0	21,5	152	21,9	6,75	21,9
1	87,7	21,5	234	22,2	6,48	22,2
2	86,6	21,4	156	22,8	6,67	22,8
3	87,2	21,5	154	22,9	6,68	22,9
4	88,5	21,5	156	23,1	6,73	23,1
5	88,9	21,6	156	23,1	6,77	23,1
6	88,4	21,6	167	23,1	6,86	23,1
7	87,8	21,6	181	22,7	6,67	22,7
8	85,4	21,6	203	22,4	6,64	22,4

Tabelle 59: Mix Pflanzenschutzmittel.

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	94,6	21,0	280	20,4	6,71	20,4
1	94,4	21,0	149	20,6	6,86	20,6
2	93,3	20,9	146	20,7	6,90	20,7
3	95,2	20,9	146	20,7	6,93	20,7
4	92,6	20,8	146	20,8	6,94	20,8
5	92,4	20,8	147	20,8	6,96	20,8
6	94,2	20,7	147	20,8	6,97	20,8
7	92,0	20,7	146	20,8	6,97	20,8
8	93,7	20,6	147	20,8	6,99	20,8
9	93,4	20,6	147	20,8	6,98	20,8

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	93,4	21,2	158	22,0	6,78	22,0
1	88,1	21,1	468	23,4	6,33	23,4
2	87,7	21,0	159	24,0	6,57	24,0
3	88,5	21,0	150	23,5	6,60	23,5
4	87,5	20,9	149	22,8	6,62	22,8
5	87,9	20,9	167	23,7	6,63	23,7
6	87,2	20,9	150	23,8	6,56	23,8
7	88,6	20,8	150	23,8	6,58	23,8
8	86,4	20,8	152	23,7	6,41	23,7
9	83,9	20,8	152	23,0	6,41	23,0

Tabelle 60: Mischung auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe (unähnliche Wirkmechanismen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	96,4	21,1	220	20,3	6,88	20,3
1	93,6	21,0	149	20,5	6,97	20,5
2	93,5	20,9	149	20,5	6,99	20,5
3	93,9	20,9	149	20,5	7,00	20,5
4	93,7	20,8	149	20,5	7,00	20,5
5	93,4	20,8	151	20,5	7,02	20,5
6	93,7	20,8	152	20,5	7,01	20,5
7	93,7	20,7	157	20,5	6,97	20,5
8	92,4	20,7	166	20,5	6,89	20,5
9	93,3	20,7	184	20,5	6,72	20,5
10	93,7	20,6	221	20,5	6,22	20,5

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	95,1	20,4	159	22,0	6,71	22,0
1	90,5	20,3	222	20,4	6,46	20,4
2	90,3	20,3	160	21,5	6,61	21,5
3	90,0	20,3	157	22,2	6,58	22,2
4	90,4	20,5	157	22,6	6,67	22,6
5	90,9	20,6	159	22,8	6,72	22,8
6	90,1	20,5	160	23,1	6,68	23,1
7	90,5	20,5	167	23,2	6,70	23,2
8	89,0	20,5	178	23,2	6,54	23,2
9	93,5	20,4	200	23,0	6,55	23,0
10	87,5	20,5	232	22,7	6,54	22,7

Tabelle 61: Mischung auf Basis der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe (unähnliche Wirkmechanismen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	95,2	21,6	264	21,1	6,77	21,1
1	94,1	21,5	147	21,2	6,93	21,2
2	92,9	21,4	145	21,2	6,94	21,2
3	92,4	21,3	146	21,2	6,94	21,2
4	93,5	21,3	146	21,2	6,93	21,2
5	93,3	21,3	148	21,2	6,91	21,2
6	93,8	21,2	156	21,2	6,86	21,2
7	92,8	21,2	162	21,2	6,74	21,2
8	94,4	21,1	176	21,2	6,46	21,2
9	94,5	21,1	198	21,1	5,52	21,1

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	95,7	19,2	156	23,0	6,65	23,0
1	92,0	19,4	330	21,8	6,43	21,8
2	90,7	19,5	160	22,2	6,58	22,2
3	91,6	19,7	154	23,3	6,66	23,3
4	91,1	19,8	152	23,6	6,68	23,6
5	91,0	19,8	155	23,8	6,65	23,8
6	90,7	19,9	165	24,0	6,67	24,0
7	89,9	20,1	172	24,0	6,54	24,0
8	89,3	20,2	187	23,9	6,43	23,9
9	89,4	20,3	208	23,3	6,42	23,3

Tabelle 62: Mischung auf Basis der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe (partiell ähnliche Wirkmechanismen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	96,2	23,7	202	23,9	7,16	23,9
1	94,9	23,7	165	24,0	6,84	24,0
2	93,7	23,5	176	23,5	6,41	23,5
3	95,3	23,4	192	23,2	5,74	23,2
4	95,3	23,2	217	23,5	5,22	23,5
5	96,7	23,1	257	23,7	4,96	23,7

Tabelle 63: Mischung auf Basis der LC₁₀(48h) der Einzelstoffe (partiell ähnliche Wirkmechanismen).

Zeitpunkt t = 0

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	97,2	23,4	190	23,3	7,32	23,3
1	93,5	23,3	151	23,6	7,39	23,6
2	92,9	23,2	150	23,6	7,37	23,6
3	93,2	23,2	151	23,6	7,34	23,6
4	93,6	23,1	152	23,6	7,30	23,6
5	93,3	23,2	153	23,5	7,23	23,5
6	93,2	23,2	156	23,5	7,14	23,5
7	93,8	23,3	160	23,5	6,94	23,5
8	93,5	23,3	169	23,5	6,54	23,5
9	94,1	23,2	193	23,5	5,49	23,5
10	95,4	23,3	242	23,2	4,82	23,2

Zeitpunkt t = 48

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	92,6	26,2	159	27,1	6,72	27,1
1	91,6	26,1	376	26,8	6,93	26,8
2	90,9	26,1	165	27,2	7,03	27,2
3	90,0	25,9	167	27,4	6,92	27,4
4	90,4	25,9	161	27,7	6,99	27,7
5	90,9	25,9	168	27,9	6,96	27,9
6	90,3	25,9	168	27,9	6,94	27,9
7	88,9	25,9	173	27,6	6,67	27,6
8	89,2	26,1	179	27,5	6,51	27,5
9	90,5	25,9	201	27,5	6,12	27,5
10	90,7	25,8	257	26,9	4,96	26,9

Tabelle 64: NOEC-Mischungen.

Zeitpunkt t = 0 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [%]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	96,4	26,9	148	27,1	7,21	27,1
NOEC 1 (m pH)	95,3	28,2	332	29,8	7,0	29,8
NOEC 1 (o pH)	95,1	28,2	n.b.	n.b.	5,05	39,5
NOEC 2 (m pH)	94,8	28,3	749	30,7	7,08	30,7
NOEC 2 (o pH)	93,7	28,4	n.b.	n.b.	3,31	31,0
NOEC 3 (m pH)	96,8	23,4	460	23,4	7,12	23,4
NOEC 3 (o pH)	96,7	23,5	n.b.	n.b.	4,83	23,5

Zeitpunkt t = 48 (n.b.: nicht bestimmt)

Konzentration [mg/L]	Sauerstoff [mg/L]	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [μS/cm]	Temperatur [°C]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Kontrolle	96,8	26,2	156	26,0	6,68	26,0
NOEC 1 (m pH)	93,6	26,2	392	26,8	6,54	26,8
NOEC 1 (o pH)	93,7	26,1	431	26,5	4,78	26,5
NOEC 2 (m pH)	94,4	26,1	684	26,6	6,37	26,6
NOEC 2 (o pH)	94,3	26,2	545	26,8	3,37	26,8
NOEC 3 (m pH)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
NOEC 3 (o pH)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Eintragungspfade von Human- und Veterinärpharmaka in die aquatische Umwelt (verändert nach Stroh, 2005).....	3
Abbildung 2-1: Zwei Männchen und ein Weibchen (Hertl, 1992).	7
Abbildung 2-2: Laichschale mit Abdeckgitter und Laichsubstrat aus Plastikbäumchen.	9
Abbildung 2-3: Haushaltssieb und Flachbodenschale.	10
Abbildung 2-4: Stadien der normalen Embryonalentwicklung: a) Zygote; b) 2-Zellstadium; c) 4-Zellstadium; d) 8-Zellstadium; e) 16-Zellstadium ; f) hohe Blastula, etwa 4 Stunden nach der Befruchtung; g) Gastrulation, Dotter zu etwa 50% umwachsen, ca. 8 Stunden nach der Befruchtung; h) Gastrulation, etwa 100% Epibolie, ca. 12 Stunden nach der Befruchtung i) etwa 9-Somiten-Stadium; j) etwa 12-Somiten-Stadium; k) Embryo 24 h nach der Befruchtung; l) Embryo 48 h nach der Befruchtung (A: Augenanlage; K: Kopfanlage, S: Schwanzanlage; So: Somiten; Abbildungen 5 a, b, e aus Richter, 1999).....	13
Abbildung 2-5: Koagulierter Embryo.	15
Abbildung 2-6: a) gelig durchscheinende Blastula-ähnliche Gestalt eines unbefruchteten Embryos; b) großzellige hohe Blastula; c) zwei-geteilte hohe Blastula; d) seitlich an der Blastula abgeschnürte Bläschen (Schulte, 1997).	16
Abbildung 2-7: Embryo mit Hantelsyndrom etwa 8 Stunden nach der Befruchtung.	17
Abbildung 2-8: a) gelblich verfärbter Embryo; b) Embryo mit Kopfdeformation.; c, d) Embryonen mit deformierten Wirbelsäulen; e-h) Embryonen mit deformierten Schwänzen: e) verkürzter Schwanz und deformierte Somiten („Vorbereitung“); f) „Knick“; g) „Schlinge“; h) „Sprungfeder“; i) in Entwicklung verzögerter Embryo mit fehlender Augenanlage und Schwanzablösung vom Dotter; j) Embryo mit Somiten jedoch ohne Kopf und Schwanz; k) Embryo nur mit Schwanzanlage; l) Embryo nach 24h „Dotter und Gewebe“, keine embryonalen Strukturen erkennbar.....	18
Abbildung 2-9: a; b) in Überzahl ausgebildete Otolithen (b: Brust, 2001); c) normal paarig ausgebildete Otolithen; d) fehlende Otolithen (Brust, 2001).	19
Abbildung 2-10: a) normal pigmentierter Embryo nach 48h; b,c) reduzierte Pigmentierung; d) fehlende Pigmentierung (a-d aus Maiwald, 1997).	19
Abbildung 2-11: a) Embryo mit Perikardödem (Foto: M. Zimmer); b) Embryo mit Dotterödem; c) Schwanzödem.	20
Abbildung 2-12: Vorgehen bei der Analyse der Kombinationswirkung von Chemikalien (verändert nach Grimme et al., 2000).	15
Abbildung 2-13: 24-Wellplatte mit 4 internen Kontrollen (Kreis).	28
Abbildung 2-14: Strukturformel von Acetylcystein (ACC; arge Elbe, 2002).	34
Abbildung 2-15: Strukturformel von Acetylsalicylsäure (ASS; BLAC, 1999).	35
Abbildung 2-16: Strukturformel von Atropin (wikipedia, 2008).....	36
Abbildung 2-17: Strukturformel von Bezafibrat (BLAC, 1999).....	37
Abbildung 2-18: Strukturformel von Bisoprolol (BLAC, 1999).	38
Abbildung 2-19: Strukturformel von Carbamazepin.	39
Abbildung 2-20: Strukturformel von Carbaryl (wikipedia, 2008).	40
Abbildung 2-21: Strukturformel von Chloramphenicol (BLAC, 1999).	41
Abbildung 2-22: Strukturformel von Clarithromycin (BLAC, 1999).....	42
Abbildung 2-23: Strukturformel von Clenbuterol (BLAC, 1999).	43
Abbildung 2-24: Strukturformel von Clofibrinsäure (BLAC, 1999).....	44
Abbildung 2-25: Strukturformel von Coffein (Sattelberger, 1999).	45
Abbildung 2-26: Strukturformel von Cyclophosphamid (BLAC, 1999).	46
Abbildung 2-27: Strukturformel von Diclofenac (BLAC, 1999).....	47

Abbildung 2-28: Strukturformel von Erythromycin (BLAC, 1999).	48
Abbildung 2-29: Strukturformel von 17- α -Ethinylöstradiol (EE ₂ , BLAC, 1999).	49
Abbildung 2-30: Strukturformel von Fenofibrat (BLAC, 1999).	50
Abbildung 2-31: Strukturformel von Ibuprofen (BLAC, 1999).	51
Abbildung 2-32: Strukturformel von Ifosfamid (BLAC, 1999).	52
Abbildung 2-33: Strukturformel von Malathion (wikipedia, 2008).	53
Abbildung 2-34: Strukturformel von Metoprolol (BLAC, 1999).	54
Abbildung 2-35: Strukturformel von Naproxen (BLAC, 1999).	55
Abbildung 2-36: Strukturformel von Oxytetrazyklin (BLAC, 1999).	56
Abbildung 2-37: Strukturformel von Paracetamol (wikipedia, 2008).	57
Abbildung 2-38: Strukturformel von Parathion (wikipedia, 2008).	58
Abbildung 2-39: Strukturformel von Propranolol (BLAC, 1999).	59
Abbildung 2-40: Strukturformel von Roxithromycin (BLAC, 1999).	60
Abbildung 2-41: Strukturformel von Salbutamol (BLAC, 1999).	61
Abbildung 2-42: Strukturformel von Sulfamethoxazol (BLAC, 1999).	62
Abbildung 2-43: Strukturformel von Tamoxifen (Sattelberger, 1999).	63
Abbildung 2-44: Strukturformel von Terbutalin (BLAC, 1999).	64
Abbildung 2-45: Strukturformel von Theophyllin (Sattelberger, 1999).	65
Abbildung 2-46: Strukturformel von Trimethoprim (BLAC, 1999).	66
Abbildung 2-47: Strukturformel von Valproinsäure (wikipedia, 2008).	67
Abbildung 2-48: Strukturformel von Verapamil (wikipedia, 2008).	68
Abbildung 3-1: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der ASS-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	76
Abbildung 3-2: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).	80
Abbildung 3-3: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	83
Abbildung 3-4: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Ibuprofen-Konzentration. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	87
Abbildung 3-5: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Ibuprofen-Konzentration. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	90

- Abbildung 3-6: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Naproxen-Konzentration. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert). 94
- Abbildung 3-7: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Naproxen-Konzentration. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert). 97
- Abbildung 3-8: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar). 101
- Abbildung 3-9: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert). 104
- Abbildung 3-10: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den fünf Einzelstoffen der Gruppe der Analgetika unter Berücksichtigung aller vier letaler Endpunkte: a) Acetylsalicylsäure b) Diclofenac; c) Ibuprofen; d) Naproxen; e) Paracetamol (ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; aEP: alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt; sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen). 107
- Abbildung 3-11: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den fünf Einzelstoffen der Gruppe der Analgetika unter ausschließlicher Berücksichtigung der koagulierten Embryonen: a) Acetylsalicylsäure b) Diclofenac; c) Ibuprofen; d) Naproxen; e) Paracetamol (ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; koa: nur die koagulierten Embryonen als letale gewertet; sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen). 108
- Abbildung 3-12: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Chloramphenicol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz

	im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).....	112
Abbildung 3-13:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clarithromycin- Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle.	115
Abbildung 3-14:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Erythromycin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle.	117
Abbildung 3-15:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Oxytetracyklin- Konzentration im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	120
Abbildung 3-16:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Oxytetracyklin-Konzentration im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts- Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	122
Abbildung 3-17:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Roxithromycin-Konzentration beim Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Williams-Test).	125
Abbildung 3-18:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Roxithromycin-Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.....	126
Abbildung 3-19:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Sulfamethoxazol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).	128
Abbildung 3-20:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Trimethoprim-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).	130
Abbildung 3-21:	Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Einzelstoffen der Gruppe der Antibiotika (mpH: Versuch mit Einstellung des pH-Wertes; opH: Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes; sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	132
Abbildung 3-22:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der ACC-Konzentration im Versuch Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	136
Abbildung 3-23:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der ACC-Konzentration im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).	139

Abbildung 3-24: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Atropin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test).	142
Abbildung 3-25: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Einzelstoffen der Gruppe der Antidote (m pH: Versuch mit Einstellung des pH-Wertes; o pH: Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes; sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	144
Abbildung 3-26: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Carbamazepin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test).	147
Abbildung 3-27: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Valproinsäure-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	150
Abbildung 3-28: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Einzelstoffen der Gruppe der Antiepileptika (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	152
Abbildung 3-29: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Bisoprolol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).	156
Abbildung 3-30: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Metoprolol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts- Test).	159
Abbildung 3-31: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Propranolol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	162
Abbildung 3-32: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Einzelstoffen der Gruppe der β -Blocker (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	164

Abbildung 3-33:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clenbuterol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	168
Abbildung 3-34:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clenbuterol-Konzentration im Vorversuch. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts- Test).....	169
Abbildung 3-35:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Salbutamol-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts- Test).	171
Abbildung 3-36:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Terbutalin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.	174
Abbildung 3-37:	Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Einzelstoffen der Gruppe der β -Sympathomimetika (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	175
Abbildung 3-38:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der EE_2 -Konzentration beim Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	178
Abbildung 3-39:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der EE_2 -Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum(*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	180
Abbildung 3-40:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Tamoxifen-Konzentration beim Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	184
Abbildung 3-41:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Tamoxifen-Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Median, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts- Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	187
Abbildung 3-42:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Verapamil-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	191

Abbildung 3-43: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Verapamil-Konzentration im Vorversuch. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).	192
Abbildung 3-44: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der drei Einzelstoffen der Gruppe mit unähnlichen Wirkmechanismen (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	194
Abbildung 3-45: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Bezafibrat- Konzentration für den Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.....	197
Abbildung 3-46: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Bezafibrat-Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.....	199
Abbildung 3-47: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clofibrinsäure-Konzentration im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	202
Abbildung 3-48: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Clofibrinsäure- Konzentration im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.	203
Abbildung 3-49: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Fenofibrat-Konzentration beim Versuch in der Wellplatte. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum.....	206
Abbildung 3-50: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Fenofibrat-Konzentration beim Versuch im Rollrandglas. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$).....	208
Abbildung 3-51: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den beiden Lipid-Senkern Bezafibrat und Fenofibrat sowie des Lipid-Senker-Metaboliten Clofibrinsäure (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	209
Abbildung 3-52: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Carbaryl-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).	213
Abbildung 3-53: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Malathion-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	216

Abbildung 3-54: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Parathion-Konzentration. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).....	219
Abbildung 3-55: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den drei Acetylcholinesterasehemmern Carbaryl; Malathion; Parathion (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	221
Abbildung 3-56: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Coffein-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	225
Abbildung 3-57: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Coffein-Konzentration im Vorversuch. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test).	225
Abbildung 3-58: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Theophyllin-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar).....	229
Abbildung 3-59: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den beiden Spasmolytika Coffein und Theophyllin (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	231
Abbildung 3-60: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Cyclophosphamid-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	234
Abbildung 3-61: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Ifosfamid-Konzentration. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, $p = 0,05$, Dunetts-Test; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	238
Abbildung 3-62: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber den beiden Zytostatika Cyclophosphamid und Ifosfamid (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	240

Abbildung 3-63: Prozentuale Häufigkeit der beobachteten Effekten (hB: hohe Blastula deformiert; G: keine Gastrulation; Sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So: deformierte Somiten; Adef: deformierte Augenanlage; Kdef: Kopf deformiert; Swdef; deformierter Schwanz; Wsdef: deformierte Wirbelsäule; H: kein Herzschlag; Bk: kein Blutkreislauf; Oe: Ödeme; P: Pigmentierung; Oto: Otolithen deformiert oder fehlend).	248
Abbildung 4-1: Vergleich der beobachteten Mortalität in beiden durchgeführten Versuchen nach Clevers (2003) basierend auf allen vier letalen Endpunkten (Test 1 & Test 2) mit der Vorhersage nach dem Konzept der <i>Konzentrationsadditivität</i> (CA).	251
Abbildung 4-2: Vergleich der beobachteten Mortalität im durchgeführten Versuch nach Clevers (2003) basierend auf den koagulierten Embryonen (Test 3) mit der Vorhersage nach dem Konzept der <i>Konzentrationsadditivität</i> (CA).	252
Abbildung 4-3: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet.. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; 1: 48,9 µmol/L; 2: 97,5 µmol/L; 3: 194,9 µmol/L-; 4: 389,9 µmol/L; 5: 780 µmol/L; 6: 1559,8 µmol/L; 7: 3119,6 µmol/LP; 8: 6239,2 µmol/L; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	256
Abbildung 4-4: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts- Test; 1: 33,1 µmol/L; 2: 66 µmol/L; 3: 132 µmol/L; 4: 264,1 µmol/L; 5: 528,3 µmol/L; 6: 1056,5 µmol/L; 7: 2113 µmol/L; 8: 4226 µmol/L; 9: 8451,7 µmol/L; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	260
Abbildung 4-5: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; 1: 25,1 µmol/L; 2: 50,4 µmol/L; 3: 100,6 µmol/L; 4: 201,3 µmol/L; 5: 402,6 µmol/L; 6: 804,9 µmol/L; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	264
Abbildung 4-6: Darstellung der beobachteten Mortalität der Mischung der Analgetika (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der <i>Konzentrationsadditivität</i> (CA, rot). Die zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet	266
Abbildung 4-7: Darstellung der beobachteten Mortalität der Mischung der Analgetika (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der <i>Konzentrationsadditivität</i> (CA; rot). Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt	267

- Abbildung 4-8: Darstellung der beobachteten Mortalität der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA; rot). Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt. 267
- Abbildung 4-9: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Mischungen der Analgetika a) basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe, die mit allen vier letalen Endpunkten berechnet wurde b) basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde c) ohne Paracetamol, basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen). 272
- Abbildung 4-10: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung Acetylcholinesterasehemmer basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts- Test; 1: 3,1 µmol/L; 2: 4,6 µmol/L; 3: 7 µmol/L; 4: 10,4 µmol/L; 5: 15,6 µmol/L; 6: 23,3 µmol/L; 7: 35 µmol/L; 8: 52,6 µmol/L; 9: 78,7 µmol/L). 276
- Abbildung 4-11: Darstellung der beobachteten Mortalität der Mischung der AChE-hemmer (schwarz) mit den Vorhersagen nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA, rot). 278
- Abbildung 4-12: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Einzelstoffe und der Mischung der AChE-Hemmer (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen). 280
- Abbildung 4-13: Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen basierend ausschließlich auf den koagulierten Embryonen. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; 1: 4,3 µmol/L; 2: 8,7 µmol/L; 3: 17,3 µmol/L; 4: 34,4 µmol/L; 5: 68,8 µmol/L; 6: 137,5 µmol/L; 7: 275,4 µmol/L; 8: 550,5 µmol/L; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert). 284
- Abbildung 4-14: Vergleich der beobachteten Mortalität der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* (CA; rot). 285
- Abbildung 4-15: Beobachtete subletale Effekte nach 48-stündiger Exposition der Embryonen gegenüber der Mischung der gemischten Stoffgruppe (sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So def: Somitendeformation; Sw def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; K def: Kopfdeformation; A def: Augendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; H: kein

	Herzschlag; Oe: Ödeme; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oto: keine oder deformierte Otolithen).	287
Abbildung 4-16:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₂₀ (48h), die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; 1: 8,4 µmol/L; 2: 16,7 µmol/L; 3: 33,5 µmol/L; 4: 67,1 µmol/L; 5: 133,9 µmol/L; 6: 267,6 µmol/L; 7: 535,2 µmol/L; 8: 1070,4 µmol/L; 9: 2141,0 µmol/L; 10: 4281,6 µmol/L; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).....	291
Abbildung 4-17:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h), die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde. Dargestellt sind Mediane, Quartile sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; 1: 14,4 µmol/L; 2: 28,8 µmol/L; 3: 57,6 µmol/L; 4: 115,2 µmol/L; 5: 230,4 µmol/L; 6: 460,3 µmol/L; 7: 921,3 µmol/L; 8: 1842,1 µmol/L; 9: 3684,1 µmol/L; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).....	295
Abbildung 4-18:	Herzschläge pro Minute nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Mischung der Substanzen mit gleichen wie auch verschiedenen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h), die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen berechnet wurde. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung sowie Minimum und Maximum (*: signifikante Veränderung der Herzschlagfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, p = 0,05, Dunetts-Test; 1:20,6 µmol/L; 2: 40,6 µmol/L; 3: 80,9 µmol/L; 4: 161,7 µmol/L; 5: 323,5 µmol/L; 6: 646,5 µmol/L; 7: 1292,9 µmol/L; 8: 2586,1 µmol/L; 9: 5171,8 µmol/L; 9: 5171,8 µmol/L; 10: 10343 µmol/L; kHS: bei keinem Embryo war ein Herzschlag feststellbar; koa: alle eingesetzten Embryonen koaguliert).	301
Abbildung 4-19:	Vergleich der beobachteten Mortalität der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₂₀ (48h) der Einzelstoffe (schwarz) mit der Vorhersage nach dem Konzept der <i>Konzentrationsadditivität</i> (CA, rot).	303
Abbildung 4-20:	Vergleich der beobachteten Mortalität der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h) der Einzelstoffe (schwarz) und der Vorhersage nah dem Konzept der <i>Konzentrationsadditivität</i> (CA; rot).	303
Abbildung 4-21:	Vergleich der beobachteten Mortalität der Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h) der Einzelstoffe (schwarz) und der Vorhersage nach dem Konzept der <i>Konzentrationsadditivität</i> (CA, rot).	304
Abbildung 4-22:	Vergleich der beobachteten subletalen Effekte der multiplen Mischungen nach 48 Stunden: a) auf Basis der LC ₂₀ (48h) mit Substanzen strikt unähnlicher Wirkmechanismen; b) auf Basis der LC ₁₀ (48h) mit Substanzen strikt unähnlicher Wirkmechanismen; c) auf Basis der LC ₁₀ (48h) mit Substanzen partiell ähnlicher Wirkmechanismen (So: Somitendeformation; Sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; H: kein Herzschlag; A : Augendeformation; K def: Kopfdeformation; Sw	

def: Schwanzdeformation; Ws def: Wirbelsäulendeformation; Bk: kein Blutkreislauf; P: reduzierte oder fehlende Pigmentierung; Oe: Ödeme; Oto: keine oder deformierte Otolithen)..... 307

Abkürzungsverzeichnis

μS:	Mikro-Siemens
Abb.:	Abbildung
ACC:	Acetylcystein
AChE:	Acetylcholinesterase
Adef:	deformierte Augenanlage
aE:	alle exponierten Embryonen
aEP:	basierend auf allen vier letalen Endpunkten
AF:	assessment factor, Sicherheitsfaktor
AMG:	Arzneimittelgesetz
Ana:	Analgetika
arge-elbe:	Arbeitsgemeinschaft für Reinhaltung der Elbe
ASS:	Acetylsalicylsäure
b:	Steigung
BCF:	Biokonzentrationsfaktor
Bk:	Blutkreislauf
BLAC:	Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Chemikaliensicherheit
bw:	body weight
CA:	concentration addition; Konzentrationsadditivität
CaCl ₂ :	Calciumchlorid
CAS:	chemical abstract service (number)
CL:	confidence limit; Vertrauensintervall
COX:	Cyclooxygenase (-Enzyme)
CYP:	Cytochrom P ₄₅₀ -abhängige Monooxygenase
<i>DarT</i> :	<i>Danio rerio</i> -toxicity/teratogenicity assay
Dic:	Diclofenac
DIN:	Deutsches Institut für Normung e.V.
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EC _x :	effective concentration [mg/L]; die Konzentration, bei der x% der eingesetzten Testorganismen einen bestimmten Effekt zeigen
EE ₂ :	17-α-Ethinylöstradiol

EINECS:	European inventory of existing commercial chemical substances
G:	Gastrulation
GABA:	γ -Aminobuttersäure
H:	Herzschlag
hB:	hohe Blastula
HCl:	Salzsäure
HDL:	high density lipoproteins
Hfreq:	Herzschlagfrequenz
i.e.S.:	im engeren Sinn
IA:	independent action; unabhängige Wirkung
Ibu:	Ibuprofen
K:	Kontrolle
KCl:	Kaliumchlorid
Kdef:	deformierter Kopf
kHS:	kein Herzschlag
koa:	basierend auf den koagulierten Embryonen
K_{ow} :	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LC_x :	lethal concentration [mg/L]; Konzentration, bei der x% der eingesetzten Testorganismen letale Effekte zeigen
LDL:	low density lipoproteins
LD_x :	lethal dose [mg/kg bw]; Dosis, bei der x% der eingesetzten Testorganismen letale Effekte zeigen
LOEC:	lowest observed effect concentration
$MgSO_4$:	Magnesiumsulfat
MP II:	Milipore Stufe II
mpH:	mit pH-Einstellung
MPI:	Max-Planck-Institut
MW:	Molekulargewicht
$NaHCO_3$:	Natriumhydrogencarbonat
NaOH:	Natriumhydroxid
Nap:	Naproxen
NOEC:	no observed effect concentration
NSAID:	non-steroidal anti-inflammatory drugs

Oe:	Ödeme
OECD:	organisation for economic co-operation and development
oP:	ohne Paracetamol
opH:	ohne pH-Einstellung
Oto:	Otolithen
P:	Pigmentierung
Pa:	Pascal
Para:	Paracetamol
PEC:	predicted environmental concentration
pK _a :	Säurekonstante
PNEC:	predicted no effect concentration
PPAR- α :	Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PSM:	Pflanzenschutzmittel
QSAR:	quantitative structure-activity relationship
r ² :	Korrelationskoeffizient
s.o.:	siehe oben
s.u.:	siehe unten
SD:	standard deviation, Standardabweichung
So def:	deformierte Somiten
So:	Somitenanlage
Sw:	Schwanzablösung vom Dotter
Swdef:	deformierter Schwanz
Tab.:	Tabelle
TU:	toxic unit
VLDL:	very low density lipoprotein
WIK:	wild- type Kalkutta
Ws def:	deformierte Wirbelsäule

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Stadien der Embryonalentwicklung von <i>Danio rerio</i>	12
Tabelle 2-2: Toxikologische Endpunkte des Embryotests- letale Effekte (†: Endpunkt wird zum angegebenen Zeitpunkt untersucht und entspricht einer letalen Wirkung; *: Endpunkt wird zum angegebenen Zeitpunkt untersucht).	15
Tabelle 2-3: Toxikologische Endpunkte des Embryotests- subletale Effekte (* Endpunkt wird zum angegebenen Zeitpunkt überprüft).	16
Tabelle 2-4: Bestandteile ISO-Wasser.	27
Tabelle 3-1: Zusammenstellung der letalen Effekte von ASS (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	74
Tabelle 3-2: Zusammenstellung der subletalen Effekte von ASS (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	75
Tabelle 3-3: Darstellung der berechneten Werte des Versuchs mit ASS und Literaturdaten (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten; k.A.: keine Angabe im Text; koa: basierend auf den koagulierten Embryonen; -: keine Angabe möglich)....	76
Tabelle 3-4: Zusammenstellung der letalen Effekte von Diclofenac. In diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	78
Tabelle 3-5: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Diclofenac. In diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	79
Tabelle 3-6: Zusammenfassung der berechneten Werte für Diclofenac. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).	80
Tabelle 3-7: Zusammenstellung der letalen Effekte von Diclofenac. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	81
Tabelle 3-8: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Diclofenac. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	82
Tabelle 3-9: Zusammenfassung der berechneten Werte für Diclofenac. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (aE: alle exponierten Embryonen zeigen diesen Effekt; koa: basierend auf den koagulierten Embryonen; -: keine Angabe möglich).....	83
Tabelle 3-10: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h)-Werte und Literaturdaten.	84
Tabelle 3-11: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ibuprofen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	85
Tabelle 3-12: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ibuprofen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	86
Tabelle 3-13: Zusammenfassung der berechneten Werte für Ibuprofen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).	87
Tabelle 3-14: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ibuprofen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	88

Tabelle 3-15: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ibuprofen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert, -: Effekt nicht beobachtet).	89
Tabelle 3-16: Zusammenfassung der berechneten Werte für Ibuprofen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen).	90
Tabelle 3-17: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h)-Werte und Literaturdaten.	91
Tabelle 3-18: Zusammenstellung der letalen Effekte von Naproxen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	92
Tabelle 3-19: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Naproxen. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	93
Tabelle 3-20: Zusammenfassung der berechneten Werte für Naproxen beim Versuch unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).	94
Tabelle 3-21: Zusammenstellung der letalen Effekte von Naproxen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	95
Tabelle 3-22: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Naproxen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	96
Tabelle 3-23: Zusammenfassung der berechneten Werte für Naproxen. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen).	97
Tabelle 3-24: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h) und Literaturdaten.	98
Tabelle 3-25: Zusammenstellung der letalen Effekte von Paracetamol. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	99
Tabelle 3-26: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Paracetamol. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	100
Tabelle 3-27: Zusammenfassung der berechneten Werte für Paracetamol. Bei diesem Versuch wurden alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).	101
Tabelle 3-28: Zusammenstellung der letalen Effekte von Paracetamol. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	102
Tabelle 3-29: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Paracetamol. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	103
Tabelle 3-30: Zusammenfassung der berechneten Werte für Paracetamol. In diesem Versuch wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen).	104

Tabelle 3-31: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h) und Literaturdaten (aus: Landesumweltamts Brandenburg (2002)).....	105
Tabelle 3-32: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h)-Werte der einzelnen Analgetika sowie der „Spacing“-Faktoren zwischen den Werten aus beiden Versuchen (aEP: Versuch in dem alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt wurden; koa: Versuch in dem ausschließlich die koagulierten Embryonen als letal gewertet wurden).	105
Tabelle 3-33: Dargestellt sind die EC ₅₀ -Werte in µmol/L für die fünf untersuchten Substanzen in unterschiedlichen Testsystemen (ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; E: Embryo; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; -: keine Angabe).	106
Tabelle 3-34: Zusammenstellung der letalen Effekte von Chloramphenicol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	107
Tabelle 3-35: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Chloramphenicol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	108
Tabelle 3-36: Zusammenfassung der berechneten Werte für Chloramphenicol (aE: alle exponierten Embryonen zeigen diesen Effekt; -: keine Angabe möglich).	112
Tabelle 3-37: Zusammenstellung der letalen Effekte von Clarithromycin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	113
Tabelle 3-38: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Clarithromycin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	114
Tabelle 3-39: Zusammenstellung der letalen Effekte von Erythromycin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	116
Tabelle 3-40: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Erythromycin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	116
Tabelle 3-41: Zusammenstellung der letalen Effekte von Oxytetracyclin im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	118
Tabelle 3-42: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Oxytetracyclin im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	119
Tabelle 3-43: Zusammenstellung der letalen Effekte von Oxytetracyclin im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	121
Tabelle 3-44: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Oxytetracyclin im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	121
Tabelle 3-45: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h)-, NOEC und LOEC-Werte aus den beiden durchgeführten Versuchen mit Oxytetracyclin.	122
Tabelle 3-46: Zusammenstellung der letalen Effekte von Roxithromycin während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	123
Tabelle 3-47: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Roxithromycin während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	124
Tabelle 3-48: Zusammenstellung der letalen Effekte von Roxithromycin während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	125
Tabelle 3-49: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Sulfamethoxazol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	127
Tabelle 3-50: Zusammenstellung der letalen Effekte von Trimethoprim (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	129
Tabelle 3-51: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Trimethoprim (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	129
Tabelle 3-52: Darstellung der anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten LC ₅₀ (48h)-Werte für die untersuchten Antibiotika (Chlora: Chloramphenicol;	

Clarithro: Clarithromycin; Erythro: Erythromycin; Oxytetra: Oxytetracyclin;
Roxithro: Roxithromycin; Sulfame: Sulfamethoxazol; Trimetho: Trimethoprim).131

Tabelle 3-53: Zusammenstellung der letalen Effekte von ACC im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	134
Tabelle 3-54: Zusammenstellung der subletalen Effekte von ACC im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum genannten Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	135
Tabelle 3-55: Zusammenstellung der letalen Effekte von Acetylcystein im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	137
Tabelle 3-56: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Acetylcystein im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	138
Tabelle 3-57: Zusammenfassung der berechneten Werte für ACC im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes.....	139
Tabelle 3-58: Zusammenstellung der letalen Effekte von Atropin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	140
Tabelle 3-59: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Atropin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	141
Tabelle 3-60: Zusammenfassung der berechneten Werte für Atropin	142
Tabelle 3-61: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Carbamazepin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	146
Tabelle 3-62: Zusammenfassung der berechneten Werte für Carbamazepin (Hb: basierend auf fehlendem Herzschlag).	147
Tabelle 3-63: Zusammenstellung der letalen Effekte von Valproinsäure (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	148
Tabelle 3-64: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Valproinsäure (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	149
Tabelle 3-65: Zusammenfassung der berechneten Werte für Valproinsäure (-: keine Angabe möglich).	151
Tabelle 3-66: Zusammenstellung der letalen Effekte von Bisoprolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	154
Tabelle 3-67: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Bisoprolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	155
Tabelle 3-68: Zusammenfassung der berechneten Werte für Bisoprolol (-: keine Angabe möglich).	156
Tabelle 3-69: Zusammenstellung der letalen Effekte von Metoprolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	157
Tabelle 3-70: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Metoprolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	158
Tabelle 3-71: Zusammenfassung der berechneten Werte für Metoprolol (-: keine Angabe möglich).	159
Tabelle 3-72: Zusammenstellung der letalen Effekte von Propranolol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	160
Tabelle 3-73: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Propranolol (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	161
Tabelle 3-74: Zusammenfassung der berechneten Werte für Propranolol.....	162
Tabelle 3-75: Darstellung der anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten LC ₅₀ -Werte nach 48 Stunden für die drei untersuchten β -Blocker.....	163

Tabelle 3-76: Zusammenstellung der letalen Effekte von Clenbuterol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	166
Tabelle 3-77: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Clenbuterol (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet t).....	167
Tabelle 3-78: Zusammenfassung der berechneten Werte für Clenbuterol (aE: alle Embryonen bis in die niedrigste untersuchte Konzentration zeigten diesen Effekt; -: keine Angabe möglich).....	169
Tabelle 3-79: Zusammenstellung der letalen Effekte von Salbutamol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	170
Tabelle 3-80: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Salbutamol (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	171
Tabelle 3-81: Zusammenstellung der letalen Effekte von Terbutalin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	172
Tabelle 3-82: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Terbutalin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	173
Tabelle 3-83: Darstellung der anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten LC ₅₀ -Werte nach 48 Stunden für die drei untersuchten β -Sympathomimetika.	174
Tabelle 3-84: Zusammenstellung der letalen Effekte von EE ₂ während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	176
Tabelle 3-85: Zusammenstellung der subletalen Effekte von EE ₂ während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).....	177
Tabelle 3-86: Zusammenfassung der berechneten Werte für EE ₂ für den Versuch in der Wellplatte.....	178
Tabelle 3-87: Zusammenstellung der letalen Effekte von EE ₂ während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	179
Tabelle 3-88: Zusammenstellung der subletalen Effekte von EE ₂ während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).....	180
Tabelle 3-89: Zusammenstellung der letalen Effekte von Tamoxifen während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	182
Tabelle 3-90: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Tamoxifen während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).....	183
Tabelle 3-91: Zusammenfassung der berechneten Werte für Tamoxifen beim Versuch in der Wellplatte (-: keine Angabe möglich).....	184
Tabelle 3-92: Zusammenstellung der letalen Effekte von Tamoxifen während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).....	185
Tabelle 3-93: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Tamoxifen während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).....	186
Tabelle 3-94: Zusammenfassung der berechneten Werte für Tamoxifen beim Versuch im Rollrandglas (-: keine Angabe möglich).....	187
Tabelle 3-95: Darstellung der ermittelten LC ₅₀ -, EC ₅₀ - und LOEC-Werte nach 48 Stunden. Die Angaben sind in $\mu\text{mol/L}$	188
Tabelle 3-96: Zusammenstellung der letalen Effekte von Verapamil (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).....	189

Tabelle 3-97: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Verapamil (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	190
Tabelle 3-98: Zusammenfassung der berechneten Werte für Verapamil (-: keine Angabe möglich).	192
Tabelle 3-99: Darstellung der ermittelten letalen Konzentrationen nach 48 Stunden.	194
Tabelle 3-100: Zusammenstellung der letalen Effekte von Bezafibrat während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	196
Tabelle 3-101: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Bezafibrat während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	197
Tabelle 3-102: Zusammenstellung der letalen Effekte von Bezafibrat während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	198
Tabelle 3-103: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Bezafibrat während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	198
Tabelle 3-104: Zusammenstellung der letalen Effekte von Clofibrinsäure im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	200
Tabelle 3-105: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Clofibrinsäure im Versuch ohne Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	201
Tabelle 3-106: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Clofibrinsäure im Versuch mit Einstellung des pH-Wertes (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	203
Tabelle 3-107: Zusammenstellung der letalen Effekte von Fenofibrat während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	205
Tabelle 3-108: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Fenofibrat während der Exposition in der Wellplatte (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	205
Tabelle 3-109: Zusammenstellung der letalen Effekte von Fenofibrat während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	207
Tabelle 3-110: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Fenofibrat während der Exposition im Rollrandglas (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	207
Tabelle 3-111: Zusammenstellung der letalen Effekte von Carbaryl (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	211
Tabelle 3-112: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Carbaryl (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	212
Tabelle 3-113: Zusammenfassung der berechneten Werte für Carbaryl.	213
Tabelle 3-114: Zusammenstellung der letalen Effekte von Malathion (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	214
Tabelle 3-115: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Malathion (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	215
Tabelle 3-116: Zusammenfassung der berechneten Werte für Malathion (aE: bis in die niedrigste untersuchte Konzentration zeigen alle Embryonen diesen Effekt; -: keine Angabe möglich).	216
Tabelle 3-117: Zusammenstellung der letalen Effekte von Parathion-methyl (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	217
Tabelle 3-118: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Parathion-methyl (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	218
Tabelle 3-119: Zusammenfassung der berechneten Werte für Parathion (-: keine Angabe möglich).	219
Tabelle 3-120: Darstellung der anhand der beobachteten letalen Effekte berechneten LC ₅₀ -Werte nach 48 Stunden für die drei Pflanzenschutzmittel.	220

Tabelle 3-121: Zusammenstellung der letalen Effekte von Coffein (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	223
Tabelle 3-122: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Coffein (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	224
Tabelle 3-123: Zusammenfassung der berechneten Werte für Coffein.	226
Tabelle 3-124: Zusammenstellung der letalen Effekte von Theophyllin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	227
Tabelle 3-125: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Theophyllin (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	228
Tabelle 3-126: Zusammenfassung der berechneten Werte für Theophyllin (n.d.: nicht bestimmbar aus mathematischen Gründen).	229
Tabelle 3-127: Zusammenstellung der letalen Effekte von Cyclophosphamid (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	233
Tabelle 3-128: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Cyclophosphamid (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	234
Tabelle 3-129: Zusammenstellung der letalen Effekte von Ifosfamid (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	236
Tabelle 3-130: Zusammenstellung der subletalen Effekte von Ifosfamid (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	237
Tabelle 3-131: Zusammenfassung der berechneten Werte für Ifosfamid.	238
Tabelle 3-132: Zusammenfassung der Einzelstoffdaten (-: keine Berechnung der LD ₅₀ * möglich, da keine Angaben zum logK _{ow} der Substanz in der Literatur zu finden waren; *: da keine Berechnung einer LC ₅₀ möglich war, kann auch keine LD ₅₀ * angegeben werden).	243
Tabelle 3-133: Einordnung der untersuchten Substanzen anhand der ermittelten LC ₅₀ (48h)-Werte (aEP: LC ₅₀ ermittelt mit allen 4 als letal definierten Endpunkten; Hb: LC ₅₀ ermittelt mit dem Parameter „fehlender Herzschlag“; koa: LC ₅₀ ermittelt nur mit den koagulierten Embryonen; o. pH: ohne Einstellung des pH-Wertes; m. pH: mit Einstellung des pH-Wertes).	244
Tabelle 3-134: Darstellung der ermittelten letalen Konzentrationen nach 48 Stunden für Acetylsalicylsäure, wobei nur die koagulierten Embryonen in die Berechnung eingeflossen sind (CL: Vertrauensintervall).	245
Tabelle 3-135: Darstellung der beobachteten subletalen Effekte (hB: hohe Blastula deformiert; G: keine Gastrulation; Sw: keine Schwanzablösung vom Dotter; So: deformierte Somiten; Adef: deformierte Augenanlage; Kdef: Kopf deformiert; Swdef; deformierter Schwanz; Wsdef: deformierte Wirbelsäule; H: kein Herzschlag; Bk: kein Blutkreislauf; Oe: Ödeme; P: Pigmentierung; Oto: Otolithen deformiert oder fehlend; +: Effekt beobachtet).	246
Tabelle 4-1: Testkonzentrationen der beiden untersuchten Mischungen der Analgetika (Test 1& 2) nach Cleuvers (2003). Die zugrundeliegenden LC _x -Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet.	250
Tabelle 4-2: Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 1 der Mischung der Analgetika nach Cleuvers (2003), wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC _x -Werte der Einzelstoffe alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	251
Tabelle 4-3: Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 2 der Mischung der Analgetika nach Cleuvers (2003), wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC _x -	

	Werte der Einzelstoffe alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	252
Tabelle 4-4:	Testkonzentrationen für Test 1 der untersuchten Mischung der Analgetika nach dem <i>modified toxic unit approach</i> . Die zugrundeliegenden LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkten berechnet (Test 1; TU: Toxic Units).	252
Tabelle 4-5:	Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 1 der Mischung der Analgetika nach dem <i>modified toxic unit approach</i> , wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe alle vier letalen Endpunkte berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; TU: Toxic Units; -: Effekt nicht beobachtet).	253
Tabelle 4-6:	Testkonzentrationen für Test 3 der untersuchten Mischung der Analgetika nach Cleuvers (2003). Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC _x -Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt.	254
Tabelle 4-7:	Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 3 der Mischung der Analgetika nach Cleuvers (2003), wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC _x -Werte der Einzelstoffe ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	254
Tabelle 4-8:	Testkonzentrationen für Test 2 der untersuchten Mischung der Analgetika nach dem <i>modified toxic unit approach</i> . Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt	255
Tabelle 4-9:	Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 2 der Mischung der Analgetika nach dem <i>modified toxic unit approach</i> , wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; TU: Toxic Units; -: Effekt nicht beobachtet).....	255
Tabelle 4-10:	Testkonzentrationen für Test 3 der untersuchten Mischung der Analgetika ohne Paracetamol nach dem <i>modified toxic unit approach</i> . Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt	256
Tabelle 4-11:	Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 3 der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol nach dem <i>modified toxic unit approach</i> , wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; TU: Toxic Units; -: Effekt nicht beobachtet).	257
Tabelle 4-12:	Testkonzentrationen für Test 4 der untersuchten Mischung der Analgetika ohne Paracetamol mit den angepassten Konzentrationen nach dem <i>modified toxic unit approach</i> . Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt.	257
Tabelle 4-13:	Zusammenstellung der letalen Effekte für Test 4 der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol mit den angepassten Konzentrationen nach dem <i>modified toxic unit approach</i> , wobei für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt wurden (K: Kontrolle; TU: Toxic Units; -: Effekt nicht beobachtet).	258

Tabelle 4-14: Darstellung der berechneten mittleren letalen Konzentrationen (LC ₅₀ (48h), mit 95% Vertrauensintervall) für die vier untersuchten Mischungen nach dem <i>modified toxic unit approach</i> (aEP: Test basierend auf der LC ₅₀ (48h) der Einzelstoffe, die unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet wurden; koa: Test basierend auf der LC ₅₀ (48h) der Einzelstoffe, die nur unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen berechnet wurden; koa oP: Test ohne Paracetamol basierend auf der LC ₅₀ (48h) der Einzelstoffe, die nur unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen berechnet wurden).....	260
Tabelle 4-15: Testkonzentrationen der untersuchten Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet.....	261
Tabelle 4-16: Zusammenstellung der letalen Effekte Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet (1: 48,9 µmol/L; 2: 97,5 µmol/L; 3: 194,9 µmol/L-; 4: 389,9 µmol/L; 5: 780 µmol/L; 6: 1559,8 µmol/L; 7: 3119,6 µmol/LP; 8: 6239,2 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zu angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	262
Tabelle 4-17: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet (1: 48,9 µmol/L; 2: 97,5 µmol/L; 3: 194,9 µmol/L-; 4: 389,9 µmol/L; 5: 780 µmol/L; 6: 1559,8 µmol/L; 7: 3119,6 µmol/LP; 8: 6239,2 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	263
Tabelle 4-18: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Analgetika. Die zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden unter Berücksichtigung aller vier letalen Endpunkte berechnet (aEP: basierend auf allen vier letalen Endpunkten).	264
Tabelle 4-19: Testkonzentrationen untersuchten Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt.....	265
Tabelle 4-20: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (1: 33,1 µmol/L; 2: 66 µmol/L; 3: 132 µmol/L; 4: 264,1 µmol/L; 5: 528,3 µmol/L; 6: 1056,5 µmol/L; 7: 2113 µmol/L; 8: 4226 µmol/L; 9: 8451,7 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	265
Tabelle 4-21: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (1: 33,1 µmol/L; 2: 66 µmol/L; 3: 132 µmol/L; 4: 264,1 µmol/L; 5: 528,3 µmol/L; 6: 1056,5 µmol/L; 7: 2113 µmol/L; 8: 4226 µmol/L; 9: 8451,7 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	267
Tabelle 4-22: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Analgetika. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC ₂₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen).	269

- Tabelle 4-23: Testkonzentrationen untersuchten Mischung der Analgetika ohne Paracetamol. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt. 269
- Tabelle 4-24: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (1: 25,1 µmol/L; 2: 50,4 µmol/L; 3: 100,6 µmol/L; 4: 201,3 µmol/L; 5: 402,6 µmol/L; 6: 804,9 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet). 207
- Tabelle 4-25: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Analgetika ohne Paracetamol. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (1: 25,1 µmol/L; 2: 50,4 µmol/L; 3: 100,6 µmol/L; 4: 201,3 µmol/L; 5: 402,6 µmol/L; 6: 804,9 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert, -: Effekt nicht beobachtet). 271
- Tabelle 4-26: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Analgetika ohne Paracetamol. Für die Berechnung der zugrundeliegenden LC₂₀(48h)-Werte der Einzelstoffe wurden ausschließlich die koagulierten Embryonen berücksichtigt (koa: basierend auf den koagulierten Embryonen; oP: ohne Paracetamol). 273
- Tabelle 4-27: Darstellung der anhand der beobachteten Effekte berechneten und der nach dem Konzept der *Konzentrationsadditivität* vorhergesagten LC₅₀(48h)-Werte (95% Vertrauensintervalle) sowie den „Spacing“-Faktoren zwischen Vorhersage und Beobachtung (Ana aEP: Versuch basierend auf der LC₂₀(48h), die mit allen vier letalen Endpunkten ermittelt wurde; Ana koa: Versuch basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen ermittelt wurde; Ana koa oP: . Versuch ohne Paracetamol basierend auf der LC₂₀(48h) der Einzelstoffe, die ausschließlich mit den koagulierten Embryonen ermittelt wurde). 276
- Tabelle 4-28: Darstellung der berechneten LC₅₀(48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischungen der Analgetika (aEP: Versuch, in dem alle vier letalen Endpunkten berücksichtigt wurden; ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; koa: Versuch, in dem ausschließlich die koagulierten Embryonen als letal gewertet wurden; koa oP: Versuch ohne Paracetamol, in dem ausschließlich die koagulierten Embryonen als letal gewertet wurden; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol). 277
- Tabelle 4-29: Berechnete Effektkonzentrationen für die Versuche mit den Einzelstoffen und der Mischung, bei denen jeweils alle vier letalen Endpunkte für die Berechnung der LC_x-Werte berücksichtigt wurden (ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; -: keine Angabe möglich). 278
- Tabelle 4-30: Berechnete Effektkonzentrationen für die Versuche mit den Einzelstoffen und der Mischung, bei denen ausschließlich die koagulierten Embryonen für die Berechnung der LC_x-Werte berücksichtigt wurden (aE: alle eingesetzten Embryonen zeigen diesen Effekt; ASS: Acetylsalicylsäure; Dic: Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; -: keine Angabe möglich). 279
- Tabelle 4-31: Berechnete Effektkonzentrationen für die Versuche mit den Einzelstoffen und der Mischung ohne Paracetamol, bei denen ausschließlich die koagulierten Embryonen für die Berechnung der LC_x-Werte berücksichtigt wurden (aE: alle eingesetzten Embryonen zeigen diesen Effekt; ASS: Acetylsalicylsäure; Dic:

Diclofenac; Ibu: Ibuprofen; Nap: Naproxen; Para: Paracetamol; -: keine Angabe möglich).	279
Tabelle 4-32: Testkonzentrationen der Kombination AChE-hemmer.	281
Tabelle 4-33: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der AChE-Hemmer (1: 3,1 µmol/L; 2: 4,6 µmol/L; 3: 7 µmol/L; 4: 10,4 µmol/L; 5: 15,6 µmol/L; 6: 23,3 µmol/L; 7: 35 µmol/L; 8: 52,6 µmol/L; 9: 78,7 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	282
Tabelle 4-34: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der AChE-Hemmer (1: 3,1 µmol/L; 2: 4,6 µmol/L; 3: 7 µmol/L; 4: 10,4 µmol/L; 5: 15,6 µmol/L; 6: 23,3 µmol/L; 7: 35 µmol/L; 8: 52,6 µmol/L; 9: 78,7 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	283
Tabelle 4-35: Darstellung des anhand der beobachteten Effekte berechneten und des nach dem Konzept der <i>Konzentrationsadditivität</i> vorhergesagten LC ₅₀ (48h)-Werts (95% Vertrauensintervalle) sowie des „Spacing“-Faktor zwischen Vorhersage und Beobachtung	286
Tabelle 4-36: Darstellung der berechneten mittleren letalen Konzentrationen (LC ₅₀ (48h), mit 95% Vertrauensintervall) für die drei Vorversuche mit den PSM nach dem <i>modified toxic unit approach</i> (n.b.: nicht bestimmbar aufgrund mathematischer Gründe; oC: Versuch ohne Carabaryl).	286
Tabelle 4-37: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischungen der PSM	286
Tabelle 4-38: Darstellung der ermittelten Effektkonzentrationen der Einzelstoffe und der Mischung der AChE-hemmer (aE: alle eingesetzten Embryonen zeigen diesen Effekt; -: keine Angabe möglich).	289
Tabelle 4-39: Testkonzentrationen der Mischung der Substanzen mit unähnlichen Wirkmechanismen.	289
Tabelle 4-40: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Substanzen unähnlicher Wirkmechanismen (1: 4,3 µmol/L; 2: 8,7 µmol/L; 3: 17,3 µmol/L; 4: 34,4 µmol/L; 5: 68,8 µmol/L; 6: 137,5 µmol/L; 7: 275,4 µmol/L; 8: 550,5 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	290
Tabelle 4-41: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Substanzen unähnlicher Wirkmechanismen (1: 4,3 µmol/L; 2: 8,7 µmol/L; 3: 17,3 µmol/L; 4: 34,4 µmol/L; 5: 68,8 µmol/L; 6: 137,5 µmol/L; 7: 275,4 µmol/L; 8: 550,5 µmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	291
Tabelle 4-42: Darstellung des anhand der beobachteten Effekte berechneten und des nach dem Konzept der Konzentrationsadditivität vorhergesagten LC ₅₀ (48h)-Wertes sowie des „Spacing“-Faktors zwischen Beobachtung und Vorhersage.	293
Tabelle 4-43: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h) der Einzelstoffe und der Mischung.	294
Tabelle 4-44: Testkonzentrationen der Mischung der Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₂₀ (48h) der Einzelstoffe.	296
Tabelle 4-45: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₂₀ (48h) der Einzelstoffe (1: 8,4 µmol/L; 2: 16,7 µmol/L; 3: 33,5 µmol/L; 4: 67,1 µmol/L; 5: 133,9 µmol/L; 6: 267,6 µmol/L; 7: 535,2 µmol/L; 8: 1070,4 µmol/L; 9: 2141,0 µmol/L; 10: 4281,6 µmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	297
Tabelle 4-46: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₂₀ (48h) der Einzelstoffe (1: 8,4 µmol/L; 2: 16,7 µmol/L; 3: 33,5 µmol/L; 4: 67,1 µmol/L; 5: 133,9 µmol/L; 6: 267,6 µmol/L; 7: 535,2 µmol/L; 8: 1070,4 µmol/L; 9: 2141,0	

μmol/L; 10: 4281,6 μmol/L; K: Kontrolle, koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	298
Tabelle 4-47: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen auf Basis der LC ₂₀ (48h) der Einzelstoffe.	300
Tabelle 4-48: Testkonzentrationen der Mischung von Stoffen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h) der Einzelstoffe.	300
Tabelle 4-49: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h) der Einzelstoffe(1: 14,4 μmol/L; 2: 28,8 μmol/L; 3: 57,6 μmol/L; 4: 115,2 μmol/L; 5: 230,4 μmol/L; 6: 460,3 μmol/L; 7: 921,3 μmol/L; 8: 1842,1 μmol/L; 9: 3684,1 μmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	301
Tabelle 4-50: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h) der Einzelstoffe (1: 14,4 μmol/L; 2: 28,8 μmol/L; 3: 57,6 μmol/L; 4: 115,2 μmol/L; 5: 230,4 μmol/L; 6: 460,3 μmol/L; 7: 921,3 μmol/L; 8: 1842,1 μmol/L; 9: 3684,1 μmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	302
Tabelle 4-51: Zusammenfassung der berechneten Werte für die Mischung der Stoffe mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen auf Basis der LC ₁₀ (48h) der Einzelstoffe.	303
Tabelle 4-52: Testkonzentrationen der Mischung von Stoffen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₂₀ (48h) der Einzelstoffe.	304
Tabelle 4-53: Zusammenstellung der letalen Effekte Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₂₀ (48h) der Einzelstoffe (1: 2495,7 μmol/L; 2: 3743,2 μmol/L; 3: 5614,9 μmol/L; 4: 8422,4 μmol/L; 5: 12633,2 μmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	305
Tabelle 4-54: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₂₀ (48h) der Einzelstoffe (1: 2495,7 μmol/L; 2: 3743,2 μmol/L; 3: 5614,9 μmol/L; 4: 8422,4 μmol/L; 5: 12633,2 μmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	305
Tabelle 4-55: Testkonzentrationen der Mischung von Stoffen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h) der Einzelstoffe.	306
Tabelle 4-56: Zusammenstellung der letalen Effekte der Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h) der Einzelstoffe (1:20,6 μmol/L; 2: 40,6 μmol/L; 3: 80,9 μmol/L; 4: 161,7 μmol/L; 5: 323,5 μmol/L; 6: 646,5 μmol/L; 7: 1292,9 μmol/L; 8: 2586,1 μmol/L; 9: 5171,8 μmol/L; 10: 10343 μmol/L; K: Kontrolle; -: Effekt nicht beobachtet).	307
Tabelle 4-57: Zusammenstellung der subletalen Effekte der Mischung der Stoffe mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen basierend auf der LC ₁₀ (48h) der Einzelstoffe (1:20,6 μmol/L; 2: 40,6 μmol/L; 3: 80,9 μmol/L; 4: 161,7 μmol/L; 5: 323,5 μmol/L; 6: 646,5 μmol/L; 7: 1292,9 μmol/L; 8: 2586,1 μmol/L; 9: 5171,8 μmol/L; 10: 10343 μmol/L; K: Kontrolle; koa: alle eingesetzten Embryonen zum angegebenen Zeitpunkt koaguliert; -: Effekt nicht beobachtet).	308
Tabelle 4-58: Darstellung der beobachteten und nach dem Konzept der <i>Unabhängigen Wirkung</i> erwarteten letalen Effekte der höchsten untersuchten Konzentration (ähnl WM: Mischung aus Substanzen mit partielle ähnlichen Wirkmechanismen; unähnl WM: Mischung aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen).	310

Tabelle 4-59: Darstellung der anhand der beobachteten Effekte berechneten und der nach dem Konzept der <i>Konzentrationsadditivität</i> vorhergesagten LC ₅₀ (48h)-Werte (95% Vertrauensintervall) sowie der „Spacing“-Faktoren zwischen Vorhersage und Beobachtung (ähnl WM: Mischung aus Substanzen mit partielle ähnlichen Wirkmechanismen; unähnl WM: Mischung aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen).....	312
Tabelle 4-60: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischungen (unähnl WM: Mischung aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen).	313
Tabelle 4-61: Darstellung der berechneten LC ₅₀ (48h)-Werte der Einzelstoffe und der Mischungen (ähnl WM: Mischung aus Substanzen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen).	313
Tabelle 4-62: Berechnete Effektkonzentrationen für die untersuchten multiplen Mischungen (ähnl WM: Mischung aus Substanzen mit partiell ähnlichen Wirkmechanismen; unähnl WM: Mischung aus Substanzen mit strikt unähnlichen Wirkmechanismen).	316
Tabelle 4-63: Zusammensetzung der drei untersuchten Ansätze auf Basis der NOEC der Einzelstoffe (+: in der Mischung enthalten).	317
Tabelle 4-64: Zusammenstellung der letalen Effekte der NOEC-Ansätze (K: Kontrolle; m. pH: mit Einstellung des pH-Wertes; o. pH: ohne Einstellung des pH-Wertes; -: Effekt nicht beobachtet).	318
Tabelle 4-65: Vergleich der beobachteten und berechneten Effekte für die NOEC-Konzentrationen der Einzelstoffe sowie die Vorhersagen nach dem Konzept der <i>Unabhängigen Wirkung</i>	319

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anja Kehrer
Geburtstag: 21.04.1980
Geburtsort: Frankenberg
Anschrift: Dr.-W.-Külz-Str. 31
09618 Brand-Erbisdorf
Telefon: 037322/8392 (privat); 0340/2103-2431 (dienstlich)
E-mail: Anja.Kehrer@uba.de, anja_kehrer@yahoo.de
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1986- 1990 Grundschulausbildung EOS „Wilhelm Pieck“; Brand-Erbisdorf
1990- 1992 3. Oberschule Brand-Erbisdorf
1992- 1998 „Bernhardt-von-Cotta“- Gymnasium Brand-Erbisdorf
Abschluss: Abitur („gut“, 2,1)

Studium

1998-2004 Studium der Biologie
1998- 2000 Grundstudium an der Universität Hannover
2000- 2004 Studium an der TU Dresden (Hydrobiologie (HF), Zoologie (1.NF) und Immunologie (2.NF))

01/2004- 12/2004 Diplomarbeit am Institut für Hydrobiologie der TU Dresden, AG Ökotoxikologie; Thema: „Die Wirkung von Gemischen auf die Embryonalentwicklung des Zebrafischblings (*Danio rerio*)“

Abschluss: Diplom-Biologin (Note: „sehr gut“; 1,49)

Dissertation

10/2005-10/2008 am Institut für Hydrobiologie der TU Dresden, AG Ökotoxikologie, Thema: „Der Embryotest mit dem Zebrafischbling als Modell für die Untersuchung der Kombinationswirkung von Chemikalien“, gefördert durch die TU Dresden im Rahmen der Förderung des weiblichen wissenschaftlichen Nachwuchses

Tag der Prüfung: 19.12.2008
Abschluss: Dr. rer.nat. (Note: magna cum laude)

Wissenschaftliche Tätigkeiten

01.02.2004 bis 30.11. 2004

studentische Hilfskraft am Institut für Hydrobiologie der Fakultät für Forst-, Geo-, und Hydrowissenschaften der TU Dresden, Aufgaben: Betreuung studentischer Praktika und Mitarbeit in der Fischzucht (*Danio rerio*)

01.12.2004 bis 30.09.2005

wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Hydrobiologie der Fakultät für Forst-, Geo-, und Hydrowissenschaften der TU Dresden, Aufgaben: Mitarbeit im Projekt „GenDarT“, Betreuung studentischer Praktika und verschiedener Zuchten (*Danio rerio*, *Hyaella azteca*), sowie Aufbau einer Bilddatenbank

01.10.2005 bis 30.09.2008

wissenschaftliche Hilfskraft im Rahmen der Förderung des weiblichen wissenschaftlichen Nachwuchses der TU Dresden („Frauenförderung“); Aufgaben: Bearbeitung des Dissertationsthemas, Betreuung studentischer Praktika

01.09.2006 bis 30.09.2008

Honorarvertrag zur Betreuung der Zuchten der AG Ökotoxikologie

01.10.2008 bis 30.11.2008

wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Hydrobiologie der Fakultät für Forst-, Geo-, und Hydrowissenschaften der TU Dresden, Aufgaben: Betreuung studentischer Praktika, Betreuung der Zuchten der AG Ökotoxikologie

seit 08.12.2009

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Umweltbundesamt Dessau-Roßlau, Fachgebiet IV.1.2 Biozide

Weiterbildung

28.07. 2003 bis 05.09.2003: Betriebspraktikum im Zoo Leipzig

21.09. 2004 bis 24.09.2004: DGTP Kurs „Grundlagen der Ökotoxikologie“

25.07.2005 bis 30.07.2005: Summer Training „Forensic Entomology“ (Köln)

13.03.2006 bis 18.03.2006: Winter Training “Advanced Forensic Entomology”(Köln)

04.12.2007 bis 30.11.2008: Praktikum zur Einführung in REACH und IUCLID 5 (Chem Consult Ltd., Dresden)

Tagungen

- SETAC Europe Annual Meeting; 18.-22.04. 2004, Prag
- SETAC Europe Annual Meeting; 22.- 26.05.2005, Lille
- SETAC Europe Annual Meeting; 07.- 11.05.2006, Den Haag
- 10.Berliner Kolloquium der Gottlieb Daimler- und Karl Benz-Stiftung; Heil-Lasten, Arzneimittelrückstände in Gewässern; 17. 05. 2006
- SETAC Europe Annual Meeting; 20.- 24.05.2007, Porto
- SETAC GLB Tagung, 11.- 14.09.2007, Leipzig
- SETAC Europe Annual Meeting; 31.05.-04.06.2009, Göteborg
- SETAC GLB Tagung, 05.-07.10.2009, Weihenstephan

Publikationen

- Kehrer, A., Nagel, R., 2008, The investigation of mixture toxicities using the embryotest with zebrafish *Danio rerio* (DarT) - is it meaningful to use only coagulated eggs as lethal endpoint? (eingereicht)
- Die Daten der Diplomarbeit werden z.Zt. für eine Publikation zusammengefasst, Arbeitstitel: „The Effects of Different Binary Mixtures on the Embryonic Development of the Zebrafish (*Danio rerio*)“.

Vorträge

- Kehrer, A., Nagel, R., 2007, Kombinationswirkung von Analgetika im Embryotest mit Zebrafisch (*Danio rerio*): Welchen Einfluss haben die vier letalen Endpunkte auf das Ergebnis?, Vortrag SETAC GLB Tagung, 11.09.- 14.09.2007, Leipzig
- Kehrer, A., Frein, D., Kretschmar, E., Riedhammer, C., Schwarz-Schulz, B., 2009, Assessing mixture ecotoxicity of biocidal products – regulatory data requirements, scientific concepts and possible approaches, Vortrag SETAC Europe Annual Meeting; 31.05.-04.06.2009, Göteborg
- Kretschmar, E., Frein, D., Kehrer, A., Riedhammer, C., Schwarz-Schulz, B., 2009, Vor der Zulassung von Biozid-Produkten – regulatorische Datenanforderungen, Mischungstoxizität, mögliche Ansätze, Vortrag, SETAC GLB Tagung, 05.-07.10.2009, Weihenstephan

Poster

- Kehrer, A.; Tillmann; M., Jungmann, D.; Licht, O.; Nagel, R., 2005, „The Effect of Mixtures on the Embryonic Development of the Zebrafish (*Danio rerio*)“, Posterpräsentation , SETAC Europe Annual Meeting, 22.05.-26.05. 2005, Lille
- Kehrer, A., Nagel, R., 2006, „The Effect of Complex Mixtures on Embryonic Development of Zebrafish (*Danio rerio*)“, Posterpräsentation , SETAC Europe Annual Meeting, 08.05.-11.05. 2006, Den Haag
- Kehrer, A., Nagel, R., 2007, „The Investigation of Mixture Toxicities using the Embryotest with Zebrafish *Danio rerio* (DarT) - is it meaningful to use only Coagulated Eggs as Lethal Endpoint?“, Posterpräsentation , SETAC Europe Annual Meeting, 20.05.-24.05. 2007, Porto
- Kehrer, A., Jungmann. D., Rybicki, M., Nagel, R., 2009, „Die Wirkung von Pharmaka einzeln und in Kombination auf die Embryonalentwicklung des Zebraäbblings (*Danio rerio*)“, Posterpräsentation , SETAC GLB Tagung, 05.-07.10.2009, Weihenstephan

Berichte

- Jungmann, D, Zimmer, M., Gildemeister, T., Kehrer, A., 2006, Comparative Toxicology of Native Sediments from the Zschoner Bach and λ -Cyhalothrin Spiked Artificial Sediments on Embryos from *Danio rerio*, Untersuchungsbericht Syngenta

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 verschiedenen Personen erhalten.

Alle Personen, von denen Daten in die vorliegende Arbeit aufgenommen wurden, sind im Text genannt. Alle Personen, die in anderweitiger Form zu der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, werden in der Danksagung erwähnt.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines oder mehrerer Promotionsberater(s) in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke der Promotion vorgelegt.

Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Fakultät Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften der TU Dresden anerkenne.

Dresden, den 01.10.2008