

Aus der
Universitäts-Hautklinik Tübingen

**Prüfung der Eignung des Fischembryo-Toxizitätstests
an Zebrafischen als Alternative zum Tierversuch
an Mäusen im Rahmen präklinischer Antivenin-Tests**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Berger, Elisabeth Christina

2021

Dekan:

Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. T. Eigentler

2. Berichterstatter:

Professorin Dr. M. Philipp

Tag der Disputation:

17.12.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vergiftungen durch Schlangenbisse	1
1.1.1	Epidemiologischer Hintergrund.....	1
1.1.2	Giftschlangen	2
1.1.3	Zusammensetzung von Schlangengiften und klinisches Erscheinungsbild	2
1.1.4	Therapeutischer Ansatz mithilfe von Antiveninen	3
1.1.5	Verfügbarkeit von Antiveninen.....	4
1.2	Präklinische Testung von Antiveninen	5
1.2.1	WHO-Goldstandard zur Testung an Mäusen	5
1.2.2	Alternativen zum WHO-Schema.....	6
1.2.2.1	Enzyme Linked Immunsorbent Assay (ELISA)	6
1.2.2.2	Der Fischembryo-Toxizitätstest (FET)	8
1.3	Fragestellung der Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Materialien.....	11
2.2	Bereitstellung von Zebrafischen.....	14
2.2.1	Haltung von Zebrafischen.....	14
2.2.2	Zucht und Verpaarung.....	15
2.2.3	Transport und Inkubation der Fischembryonen.....	16
2.3	Fischembryonen-Entwicklung.....	16
2.4	Exposition von Fischembryonen mit Veninen	16
2.4.1	Vorgehensweise.....	16

2.4.2	Herstellen der Stammlösung	17
2.4.3	Verdünnungsreihen	17
2.4.3.1	Log-Stufen.....	18
2.4.3.2	Halbierende Verdünnungsreihe	19
2.4.4	Auswahl der Fischembryonen	20
2.4.5	Auswahl des Kontrollmediums.....	20
2.4.6	Aufbringen der Venin-Verdünnungsreihen.....	21
2.4.7	Modifizierter LC50 Versuch bei <i>Bitis arietans</i>	21
2.4.7.1	Toxizität Tween20	22
2.4.7.2	Verdünnungsreihe <i>Bitis arietans</i> mit Tween20.....	22
2.5	Exposition der Fischembryonen mit Venin und Antivenin	23
2.5.1	Ziel der Versuche	23
2.5.2	Lyophilisiertes Antivenin	24
2.5.2.1	Lyophilisierung	24
2.5.2.2	Überprüfung der Toxizität des lyophilisierten Antivenins	24
2.5.2.3	EC50-Versuch	25
2.5.3	Unbehandeltes Antivenin.....	26
2.5.3.1	EC50-Versuch	26
2.5.3.2	Modifikationen des EC50-Versuches.....	26
2.5.4	Auswahl und Einsetzen der Fischembryonen auf die Mikrotiterplatte	28
2.5.5	Aufbringen der Antivenin-Verdünnungsreihe	28
2.5.6	PH-Wert-Messung und Zusammensetzung des Antivenins	28
2.6	Analyse der Fischembryonen unter dem Mikroskop	29
2.7	Entsorgung der verwendeten Materialien	31
2.8	Statistische Methoden	31

3	Ergebnisse	32
3.1	Überlebenszeitanalysen nach Exposition mit fünf Veninen	32
3.2	LC50-Berechnung	37
3.3	Neutralisationsanalysen nach Exposition mit Gift der <i>Naja haje</i> und PSASA ...	39
3.3.1	Toxizität des Antivenins	39
3.3.2	EC50-Ergebnisse mit lyophilisiertem Antivenin.....	40
3.3.3	EC50-Ergebnisse mit unbehandeltem Antivenin.....	41
3.3.3.1	Statistische Berechnungen	43
3.4	PH-Wert-Messung und Zusammensetzung des Antivenins	44
3.5	Beobachtete Toxizität	44
3.5.1	Vitalfunktionen im subletalen Bereich	45
3.5.2	Erscheinungsbild letaler Fischembryonen	46
4	Diskussion	49
4.1	Validität der modifizierten OECD-Testkonditionen	49
4.2	Unterschiede in der Höhe der LC50 bei Elapiden- und Viperngiften	51
4.3	LC50 als Prognoseinstrument für Tierversuche	54
4.4	FET als möglicher Indikator für Neurotoxizität	57
4.5	Neutralisationseffekt durch das Antivenin	60
5	Zusammenfassung	62
6	Anhang	64
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	64
6.2	Tabellenverzeichnis.....	66
7	Literaturverzeichnis	68
8	Erklärung zum Eigenanteil	75
9	Danksagung	76

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AV	Antivenin
c	Konzentration
cm	Zentimeter
Da	Dalton
EC50	effective concentration 50
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
engl.	englisch
et al.	et alii (und andere)
E2-Medium	Embryo-2-Medium
FE	Fischembyro
FET	Fischembryo-Toxizitätstest
F(ab') ₂	Antigen-bindendes-Fragment
g	Gramm
h	Stunde
HR	Hazard Ratio
hpf	hours post fertilization
i.d.R.	in der Regel
IgE	Immunglobuline E
IgG	Immunglobuline G
IgM	Immunglobuline M
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LC50	lethal concentration 50
log	logarithmisch
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MP	Metalloprotease
ng	Nanogramm
OECD opment	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate buffered saline
PLA2	Phospholipase A2
PSASA	Polyvalent Snake Antivenom Saudi Arabia
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome coronavirus
SP	Serinprotease
t	Zeit
V	Volumen
WHO	World Health Organization
wissenschaftl.	wissenschaftlich
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
°C	Grad Celsius
3FTx	Dreifinger-Toxine

1 Einleitung

1.1 Vergiftungen durch Schlangenbisse

1.1.1 Epidemiologischer Hintergrund

Weltweit wird die Zahl der Vergiftungen durch Schlangenbisse auf ca. 1,8 bis 2,7 Millionen pro Jahr und die jährliche Zahl an Todesfällen auf bis zu 138.000 Fälle (ca. 5%) geschätzt (Chippaux, 1998, Kasturiratne et al., 2008). Gesundheitliche Folgen nicht, zu spät oder inadäquat behandelter Schlangenbisse sind oft gravierend (Mebs, 2010). Die meisten Opfer von Schlangenbissen leben in den ärmsten Gebieten der Welt (The Lancet, 2017). So sind vor allem ländliche Gegenden in Süd- und Südostasien, Subsahara-Afrika und Ozeanien betroffen (Chippaux, 1998, Kasturiratne et al., 2008).

Schlangen sind wechselwarme Tiere, die in tropischen Klimazonen ihren optimalen Lebensraum finden (Chippaux, 1998). Giftschlangen töten ihre Beute, größtenteils kleine Nagetiere, indem sie dieser ein hochgiftiges Toxingemisch injizieren und dann unzerkleinert verzehren. Sie gelten als Kulturfolger, die durch das erhöhte Nahrungsangebot an Ratten und Mäusen in landwirtschaftlichen Flächen und menschlichen Siedlungen angelockt werden. Ein Schlangenbiss ist in der Regel die Folge einer unerwarteten Begegnung, bei der das Opfer der Schlange zu nah kommt. In vielen ländlichen Regionen Afrikas und Asiens ist eine zeitnahe und umfassende medizinische Versorgung der Vergiftung, aufgrund mangelnder Infrastrukturen im Gesundheitssystem, oft nicht möglich. Vor allem bei Kindern ist die Mortalitätsrate hoch (Mebs, 2010). In den letzten Jahren wurde diese Problematik von der World Health Organization (WHO) verstärkt aufgegriffen und 2017 in die Liste der vernachlässigten Tropenkrankheiten der Kategorie A aufgenommen (The Lancet, 2017, Chippaux, 1998). Der ehemalige Generalsekretär der Vereinten Nationen, Kofi Annan bezeichnete im Jahr 2018 Schlangenbisse als die wichtigste tropische Krankheit, von der man bis jetzt nicht gehört habe (Williams et al., 2019) und kritisierte die mangelnde Aufmerksamkeit für das Thema.

1.1.2 Giftschlangen

Der Begriff Giftschlange ist kein zoologischer Ordnungsbegriff, sondern dient der Charakterisierung einer besonderen Eigenschaft. Sie verfügen über einen Giftapparat mit Drüsen zur Giftproduktion und speziell ausgebildeten Zähnen, mit denen sie das Gift in ihre Beute injizieren (Mebs, 2010). Nach heutigem Wissensstand existieren über 3000 Schlangenarten, von denen circa ein Fünftel zu den Giftschlangen zählt. Die zwei wichtigsten Schlangenfamilien der Giftschlangen sind *Elapidae* (Giftnattern) und *Viperidae* (Vipern) (Pough et al., 2004).

1.1.3 Zusammensetzung von Schlangengiften und klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild eines Schlangenbisses ist sehr variabel (Gutiérrez et al., 2017a). Schlangengifte weisen einen hohen Wassergehalt von 50% bis 90% auf. Das lyophilisierte, wasserfreie Rohgift besteht zum Großteil aus Proteinen und Polypeptiden mit toxischem und/oder enzymatischen Eigenschaften. Diese Komponenten bestimmen je nach Aktivität, Spezifität, Anteil sowie ihrer Kombination die Symptomatik der Vergiftung.

In Giften von Elapiden sind vor allem Neurotoxine zu finden, welche durch Blockierung des peripheren Nervensystems zu einer Lähmung der Muskulatur führen. Angriffspunkte der Neurotoxine können sowohl die post- als auch die präsynaptische Membran sein. Auch Zyto- und Kardiotoxine kommen vor. Sie entfalten ihre Wirkung durch lytische oder kardiotoxische Eigenschaften. Im Gegensatz dazu weisen Viperngifte hohe Konzentrationen an Enzymen auf (Mebs, 2010). Von großer Bedeutung sind Proteasen und Peptidasen, die über verschiedene Mechanismen zur Vergiftungssymptomatik beitragen (Lomonte et al., 2014, Mebs, 2010). So können hydrolysierende Enzyme, über eine Störung der körpereigenen Gerinnungskaskade, zu einer verstärkten Blutungsneigung führen. Sehr typisch für Viperngifte ist die Bildung von Ödemen und Nekrosen durch Zerstörung der Kapillaren (Mebs, 2010).

1.1.4 Therapeutischer Ansatz mithilfe von Antiveninen

Nach einem Schlangenbiss sollte schnellstmöglich eine Therapie eingeleitet werden. Erste-Hilfe-Maßnahmen wie Inzisionen oder die Unterbrechung des Blutflusses durch Anbringen eines Tourniquets werden nicht mehr empfohlen (Amaral et al., 1998, Gold et al., 2002). Stattdessen steht die Behandlung im Krankenhaus mit einem Gegengift, einem Antivenin, im Vordergrund. Die Therapie mit einem intravenös verabreichten Antivenin stellt die einzige potenziell lebensrettende Maßnahme nach einem Schlangenbiss dar (Hifumi et al., 2015, Rodrigues-Silva et al., 1999). Das erste Gegengift für Schlangenbisse wurde, Ende des 19. Jahrhunderts, von Albert Calmette entwickelt (Gutiérrez et al., 2011).

Antivenine bestehen aus Immunglobulinen (Ig), die in der Lage sind, Gifte zu neutralisieren und die toxischen Effekte zu lindern. Gewonnen werden diese aus dem Blutplasma von Säugetieren, in aller Regel von Pferden oder Schafen, denen zuvor Schlangengift in einer nicht letalen Dosis verabreicht wurde (Vargas et al., 2015). Meist handelt es sich bei Antiveninen um ein Gemisch polyvalenter Immunglobuline oder polyvalenter Immunglobulin-Fragmente (Casewell et al., 2014, Gutiérrez et al., 2011). Die Verwendung der fragmentierten Immunglobuline, $F(ab')_2$, kann das Auftreten von Nebenwirkungen gegenüber unfragmentierten Immunglobulinen reduzieren (Vargas et al., 2015, León et al., 2013).

Nebenwirkungen, die als Ergebnis einer überschießenden Immunreaktion des Körpers auf Antivenine auftreten können (Justiz Vaillant et al., 2020), treten entweder akut oder verzögert, nach ca. vier bis zwölf Tagen, auf (Lundquist et al., 2007, de Silva et al., 2016). Immunologisch vermittelte Reaktionen werden nach Coombs und Gell in vier Klassen, Typ I bis Typ IV, eingeteilt (Justiz Vaillant et al., 2020). Als akut auftretende Nebenwirkungen von Antiveninen sind vor allem allergische Reaktionen zu nennen (León et al., 2013). Diese können als IgE-vermittelte Typ-I-Reaktion vom Soforttyp auftreten. Durch Degranulation von Histamin und anderen Entzündungsmediatoren, durch Mastzellen und basophile Granulozyten (Justiz Vaillant et al., 2020), kann die Typ-I-Reaktion von milden

Symptomen wie Urtikaria, Fieber und Kopfschmerzen bis hin zum anaphylaktischen Schock reichen (de Silva et al., 2016). Es wird vermutet, dass die Mehrheit der allergischen Reaktionen nicht als reine IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen, sondern in Kombination, beispielsweise mit der Aktivierung des Komplementsystems, ablaufen (Vargas et al., 2015). Zeitlich verzögert kann die Serumkrankheit, eine Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems vom Typ III, auftreten. Diese geht mit der Bildung und anschließenden Ablagerung von Immunkomplexen, bestehend aus zirkulierenden Antigenen und IgM- bzw. IgG-Antikörpern, einher und führt ebenfalls zur Mitaktivierung des Komplementsystems (Kanji and Chant, 2010). Durch einen nicht vollständig geklärten Pathomechanismus führt die Aktivierung des Komplementsystems über die chemotaktische Wirkung der Komplementproteine zur Infiltration neutrophiler Granulozyten und damit zu Entzündungsreaktionen und perivaskulären Gewebeschädigungen (León et al., 2013). Die Ablagerungen der Immunkomplexe können eine Reihe an Symptomen bewirken. So kann es unter anderem zu Urtikaria, Fieber, Lymphadenopathie und Gelenkschmerzen kommen (de Silva et al., 2016).

1.1.5 Verfügbarkeit von Antiveninen

Ein großes Problem in der Therapie von Schlangenbissen stellt die mangelnde Verfügbarkeit von Antiveninen dar. Gründe hierfür sind nicht nur der mangelhafte Zugang zum Gesundheitssystem in Entwicklungsländern (Chippaux, 2008), sondern auch wirtschaftliche Faktoren, die die Produktion von Antiveninen behindern (Williams et al., 2011). So spielen hohe Produktionskosten sowie die mangelnde Wirtschaftlichkeit der Antivenin-Herstellung eine große Rolle (Casewell et al., 2010, Theakston and Warrell, 2000). Die Antivenine unterscheiden sich, abhängig von den zur Herstellung verwendeten Giften, in ihrer Spezifität und Effektivität Antigene zu neutralisieren (Calvete, 2017). Die Zusammensetzung von Schlangengiften variiert auf allen taxonomischen Ebenen wie Art, Spezies oder sogar zwischen lokalen Populationen. Obwohl sich Venine aus einer begrenzten Anzahl an Proteinfamilien zusammensetzen, unterscheiden sich die Anteile einzelner Proteine sowie ihre Ausprägung in einem spezifischen Venin, mit Folgen für das toxikologische und immunologische Profil des Gifts (Gutiérrez et al., 2017b).

Der Einsatz von Antiveninen auf Basis von Venomen aus anderen Regionen oder von verwandten Arten kann mangelnde Wirksamkeit sowie eine Zunahme des Nebenwirkungsprofils zur Folge haben (de Silva et al., 2011). Die Komplexität von Schlangengiften, mit ihrem breiten Spektrum an pathologischen und pathophysiologischen Manifestationen von Vergiftungen durch das Zusammenwirken verschiedener Toxine, stellt eine große Herausforderung und einen hohen Aufwand für die vorklinischen Tests zur Wirksamkeit von Antiveninen, die jedoch für die Sicherheit des Patienten erforderlich sind, dar (Gutiérrez et al., 2017b).

1.2 Präklinische Testung von Antiveninen

1.2.1 WHO-Goldstandard zur Testung an Mäusen

Seit 2008 bestehen Richtlinien der WHO zur Produktion, Kontrolle und Regulierung von Antiveninen, die zuletzt 2016 aktualisiert wurden. Es werden Kategorien von Schlangengiften nach Verbreitung der Schlangenart, z.B. in Gebieten mit hoher Bevölkerungsdichte, Häufigkeit der Schlangenbisse sowie Schwere der Vergiftungssymptomatik, die einen erheblichen Grad an Morbidität, Behinderung oder Mortalität verursachen, gebildet. Auf deren Basis wird die Entscheidung zur Herstellung von Antiveninen unter Risikoabwägung für bestimmte Regionen getroffen. Für Nordafrika, den Mittleren Osten Afrikas und das Sub-Sahara-Gebiet ist beispielsweise unter den *Viperidae* die Puffotter, *Bitis arietans*, gelistet. Die Richtlinien umfassen zudem alle Produktionsschritte der Antivenine, von der Entnahme des Schlangengiftes, Vor- und Aufbereitung der Venome, Immunisierung der Tiere, Entnahme und Behandlung des Blutplasmas, bis hin zu Vorgaben für die präklinische Testung des, aus den gewonnenen Immunglobulinen hergestellten, Antivenins. Auch ethische Leitlinien für das Tierwohl in Produktion und Testung des Antivenins sind in den Richtlinien der WHO enthalten (World Health Organization, 2016).

Als Goldstandard zur präklinischen Testung von Antiveninen gilt die Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration (engl. effective concentration 50, EC50) an Mäusen. Dieser Test ermittelt die Menge an Antivenin, die das Überleben von 50% der Versuchspopulation sichert und sie damit vor den letalen Folgen des

verabreichten Venins schützt (World Health Organization, 2016). Hierzu wird in einem ersten Schritt die mittlere letale Konzentration (engl. lethal concentration 50, LC50), ab der 50% der Population versterben, für das Venin ermittelt (Casewell et al., 2014). Im Anschluss wird den Mäusen ein Gemisch aus der drei- bis sechsfachen LC50-Dosis des Venins und verschiedenen Antiveninkonzentrationen intravenös verabreicht, um die EC50-Konzentration zu ermitteln (Casewell et al., 2014, Araujo et al., 2008, World Health Organization, 2016). Die zusätzliche Beobachtung der Neutralisationsfähigkeit pathologischer Effekte der Schlangengifte, wie Myo- und Neurotoxizität, Nekrosen, Blutungen und Aktivierung des Gerinnungssystems, wird empfohlen (World Health Organization, 2016).

Nicht immer können die ethischen und finanziellen Kosten eines Tierversuches gerechtfertigt werden (Casewell et al., 2010). Die Testung von Schlangengiften an Mäusen nach dem WHO-Schema und die damit verbundenen Schmerzen und das Leiden der Tiere, haben Bedenken über die Notwendigkeit von Tieren in der Erforschung von Antiveninen ausgelöst (World Health Organization, 2016).

Die WHO-Richtlinien zur Testung von Antiveninen enthalten auch ein, auf den drei Säulen „Ersatz, Reduktion, Verbesserung“ (engl. replacement, reduction, refinement, 3R) basierendes Konzept mit der Zielsetzung, Tierversuche durch immunologische Screening-Verfahren und In-vitro-Testverfahren zu ersetzen, die Anzahl der Tiere in Versuchsreihen zu reduzieren und das Tierwohl während der Versuchsdurchführung, z.B. durch den Einsatz von Schmerzmitteln und die zeitliche Begrenzung der Versuchsdauer, zu verbessern (Gutiérrez et al., 2017b, World Health Organization, 2016).

1.2.2 Alternativen zum WHO-Schema

1.2.2.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Casewell et al. (2014) führen als Alternative zum In-vivo-Test an Mäusen den ELISA als In-vitro-Test auf. Untersucht wird die immunologische Kreuzreaktion zwischen einem Antigen, in dieser Studie Venin, und einem Antikörper, hier Antivenin. Die Bindungskapazität des Antivenins kann so bestimmt werden.

Das Verfahren nutzt markierte Antikörper zum Nachweis der immunologischen Kreuzreaktion. Biotinylierte Antikörper werden durch Streptavidin-Meerettichperoxidase markiert. Nach Zugabe von Tetramethylbenzidin ist die Detektion der Antikörperbindungen mit einem Fotometer möglich. Der Einsatz von Streptavidin dient der Signalamplifikation (Casewell et al., 2014). Das Enzym kann entweder direkt an den Primärantikörper, das Antivenin, gebunden (direkter ELISA), oder über einen Sekundärantikörper an das Antivenin gekoppelt (indirekter ELISA), vorliegen (Lin, 2015a, Lin, 2015b). Mithilfe des ELISA kann die Menge an Antivenin (in ng) ermittelt werden, die notwendig ist, um die Hälfte des Giftes auf der Mikrotiterplatte zu binden. Je geringer dieser Wert ist, desto größer ist die Bindungskapazität eines Antivenins.

In der Diagnostik der Kreuzreaktivität von Veninen wird zunehmend der Inhibitions-Assay oder kompetitive Immunassay verwendet. Hierbei wird die Bindungsstärke zwischen Antigen und Antikörper, ebenfalls durch fluoreszierende immunologische Markierung, sichtbar gemacht. Jedoch werden bestehende Antigen-Antikörper-Bindungen durch Hinzugabe eines zweiten, zu untersuchenden, Antigens gelöst. Je stärker die Affinität zwischen dem zu untersuchenden Antigen und dem Antikörper, desto mehr, bereits bestehende, Bindungen werden aufgelöst, mit dem Ergebnis einer abgeschwächten Lichtreaktion. Die Stärke der Lichtreaktion ist umgekehrt proportional zur Bindungsstärke zwischen zu untersuchendem Antigen und Antikörper (Khanbashi et al., 2015).

Ein vielversprechender Ansatz aus der Diagnostik in der Virologie könnte der Neutralisations-ELISA darstellen. Das Hauptaugenmerk liegt auf neutralisierenden Antikörpern, die durch Bindung und Blockierung auf der Zelloberfläche viraler Partikel befindlicher Epitope das Eintreten des Virus in die Zelle verhindern und somit die virale Infektiosität reduzieren (Klasse, 2014). Im Unterschied zu herkömmlichen Neutralisationstests, bei denen die Auszählung infizierter Zellen nach immunzytochemischer Färbung unter dem Lichtmikroskop erfolgt, wird die Antigen-Antikörper-Bindung, über eine durch einen enzymkonjugierten Sekundärantikörper katalysierte Farbreaktion mittels Fotometer gemessen (Mangin,

2004). Bei der Erforschung von Impfstoffen, auch im Rahmen der aktuellen Pandemie durch das SARS-CoV-2 Virus, spielen neutralisierende Antikörper durch ihre Spezifität eine übergeordnete Rolle. Der hohe Zeitaufwand sowie der aufwendige Herstellungsprozess stellen zurzeit Limitierungen für den Einsatz dieses Tests dar (Zhou and Zhao, 2020).

Allerdings ergeben sich Einschränkungen der In-vitro-Tests gegenüber dem WHO-Schema an Mäusen. Bei Casewell et al. (2010) zeigt sich eine mangelnde Übereinstimmung der Ergebnisse der Immunassays mit den in vivo durchgeführten Neutralisationstests. Gleichmaßen wird, sowohl bei Casewell et al. (2014), als auch bei Khanbashi et al. (2015) und Mangin (2004) deutlich, dass eine Beurteilbarkeit der Wirkung des Giftes auf den Organismus in diesen Verfahren nicht möglich ist.

1.2.2.2 Der Fischembryo-Toxizitätstest (FET)

Zebrafischembryonen werden immer häufiger als effektives Versuchsmodell für toxikologische Studien chemischer Stoffe eingesetzt (Sipes et al., 2011). Die Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) hat zur Prüfung der Wirkung und Toxizität von Chemikalien Leitlinien zur Verwendung von Zebrafischembryonen als Modellorganismus entwickelt und 2013 überarbeitet (Braunbeck, 2012, OECD, 2013). Unter der Rubrik „Auswirkungen auf biologische Systeme“ werden die Vorgaben zum „akuten Toxizitätstests an Fischembryonen“ nach OECD 236 aufgeführt (OECD, 2013).

Der FET kann zwischen dem akuten Fischtest nach OECD 203 und dem Fischei-Test (DIN EN ISO 15088) eingeordnet werden.

Während der akute Fischtest, als Tierversuch, mit adulten Fischen arbeitet, wird beim Fischei-Test, der vor allem zur Untersuchung von Fischtoxizität in Wasser- und Abwasserproben eingesetzt wird, mit noch nicht geschlüpften Fischembryonen (FE) bis zu einem Alter von 48 Stunden nach Befruchtung, engl. hours post fertilization (48 hpf), gearbeitet. Der FET sieht einen Beobachtungszeitraum frisch befruchteter Fischembryonen bis zu 96 hpf vor. Als Tierversuch gilt der

Einsatz von Fischembryonen erst ab dem 5. Entwicklungstag (120 hpf) (Strähle et al., 2012).

Häufig finden Embryonen von Zebrafischen, *Danio rerio*, Verwendung. Vorteile des Einsatzes von Zebrafischen sind die schnelle, extrauterine Embryonalentwicklung und die Transparenz der frühen Entwicklungsstadien (Bertrand and Traver, 2009, Davidson and Zon, 2004). Dass sowohl die Eihülle als auch der Körper der Zebrafischembryonen transparent sind, erleichtert die Untersuchbarkeit und ermöglicht die Beobachtung des Metabolismus sowie systemischer Wechselwirkungen des Organismus (Sipes et al., 2011). Zebrafische eignen sich aufgrund der Ähnlichkeit zu Säugetieren besonders als Modellorganismus. Ca. 70% der Gene von Zebrafischen ähneln denen des Menschen (Howe et al., 2013). So entwickelt der Zebrafisch während der Embryonalphase in den ersten 48 Stunden prinzipiell alle Organsysteme, die sich bei Menschen ausbilden. Auch das Nervensystem der Zebrafische ist dem des Menschen bezüglich Organisation und Zelltypen sehr ähnlich (Kimmel et al., 1995). Die hohe Fruchtbarkeit von Zebrafischen, ihre kurze Generationszeit, die daraus resultierende gute Verfügbarkeit von Fischembryonen sowie die kleine Größe stellen weitere Vorteile für die Untersuchung von toxischen Substanzen und deren Wechselwirkung mit dem Organismus an Zebrafischen dar (National Research Council Committee on Developmental, 2000).

In der 2017 von Chan et al. publizierten Arbeit zur Einschätzung der Toxizität von Crotoamin, einem im Gift von Klapperschlangen enthaltenen Protein, wurde mit Zebrafischembryonen als Versuchsmodell gearbeitet. Die Auswirkungen nicht letaler Konzentrationen auf die Entwicklung, kardiale Funktion und Bewegungsfähigkeit der Fischembryonen, sowie die Ermittlung der LC50-Konzentration standen im Vordergrund (Chan et al., 2017).

1.3 Fragestellung der Arbeit

Eignet sich der akute Toxizitätstest an Fischembryonen im Rahmen präklinischer Antivenin-Tests als Alternative zum WHO-Tierversuch an Mäusen? Es gilt die Übertragbarkeit des WHO-Testschemas für Antivenine auf den akuten Fischembryo-Toxizitätstest an Zebrafischembryonen zu prüfen. Durch Einsatz des Fischembryo-Assays könnte eine ethisch nicht vertretbare, hohe Anzahl an Tierversuchen vermieden werden.

In einem ersten Schritt soll die giftspezifische Toxizität für ein wässriges Milieu, in diesem Zusammenhang findet die mittlere letale Konzentration Anwendung, für fünf Schlangengifte erarbeitet werden. Im Anschluss soll die Anwendbarkeit des Fischembryo-Assays in der pharmakologischen Qualitätskontrolle zur Einschätzung der Neutralisationskapazität von Antiveninen, durch Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration, geprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Gerät	Firma
Analysewaage	Sartorius Weighing Technology
Axiocam 105 color	Zeiss
Brutschrank	Heraeus, BT 5042 E
Kühlschrank	Kirsch Med 85 DIN
Lyophilisiergerät LCG	CHRIST
Magnetrührer (RCT Basic)	IKA Labortechnik
Stereomikroskop Stemi 508	Zeiss
pH-Meter	Mettler Toledo
Rüttler	Stuart gyro-rocker SSL3
„Vortex Genie 2“-Magnetrührer	Scientific Industries

Gebrauchsmaterialien	Firma
Becherglas	Schott, Duranglas
Pipetten - Eppendorf Research plus 0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl - Eppendorf 500-2500 µl	Eppendorf
Pinzetten	Dumoxel, Rustless, Non-Magnetic

Verbrauchsmaterialien	Firma
Eppendorf-Tubes 3810X	Eppendorf
Falcon-Tubes, 50 ml	Falcon
Handschuhe Vascon	B. Braun Melsungen AG
Mikrotiterplatte (96-Well)	Eppendorf
Pasteurpipetten Plastik	Art. 4894.1, Carl Roth GmbH
Petrischalen	Greiner, Art. G633161
Tuberkulinspritzen Plastipak, 1 ml - Einmal Injektionskanüle (Sterican® Gr. 1, G 20 x 1 1/2 / ø 0,90 x 40 mm, gelb)	BD Becton Dickinson

Chemikalien und Puffer	Firma
Aqua	B. Braun Melsungen AG
Formaldehyd 4,5%	Langenbrinck GmbH
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG
PBS-Puffer	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline D8537, Sigma Life Science
Tween 20	Art. 9127.1, Carl Roth GmbH
E2-Medium <u>Zusammensetzung:</u> 44 g Natriumchlorid, 12,3 g Magnesiumsulfat, 7,3 g Calciumchlorid, 3g Natriumhydrogencarbonat, 1,9 g Kaliumchlorid, 1,03 g Kaliumdihydrogenphosphat und 0,38 g Dinatriumhydrogenphosphat <u>pH-Wert:</u> 7,3 (leicht alkalisch)	Max-Planck-Institut Tübingen

Die Firma Latoxan, mit Sitz in Portes-lès-Valence in Frankreich, stellte das Gift der folgenden fünf Schlangen zur Verfügung.

Venine		Menge	Zustand
Wissenschaftlicher Name	Deutscher Name		
<i>Crotalus atrox</i>	Texas-Klapperschlange	100 mg	Weißliches Pulver
<i>Vipera ammodytes</i>	Europäische Hornviper	100 mg	Weißliches Pulver
<i>Bitis arietans</i>	Puffotter	100 mg	Weißliches Pulver
<i>Naja naja</i>	Brillenschlange	100 mg	Weißliches Pulver
<i>Naja haje</i>	Ägyptische Kobra	100 mg	Weißliches Pulver

Lagerung: in einem Kühlschrank des Labors der Hautklinik Tübingen bei 4 °C

Die Abteilung für Klinische Toxikologie des Klinikums rechts der Isar in München (Technische Universität München) stellte das, in dieser Studie verwendete, Antivenin zur Verfügung.

Antivenin	Einsatzspektrum	Menge	Zustand
Polyvalent Snake Antivenom Saudi Arabia (PSASA)	Gegen afrikanische Giftschlangen, u.a. gegen die in dieser Studie verwendeten Gifte der <ul style="list-style-type: none"> • <i>Bitis arietans</i>, • <i>Naja naja</i> und • <i>Naja haje</i> 	10 ml	Klare Flüssigkeit

Lagerung: in einem Kühlschrank des Labors der Hautklinik Tübingen bei 4 - 8 °C

Beipackzettel: PSASA ist ein polyvalentes Antivenin, das aus Pferden, die durch mehrfache Verabreichung von sechs verschiedenen Schlangengiften hyperimmunisiert wurden, gewonnen wird. Hauptbestandteil sind, nach Reinigung

und Aufbereitung, hochkonzentrierte F(ab')₂-Antikörperfragmente. Das Antivenin ist durch sein großes Wirkspektrum, nicht nur hochspezifisch in der Neutralisation der zur Herstellung verwendeten sechs Schlangengifte, sondern eignet sich darüber hinaus zur Neutralisation weiterer Schlangengifte des Mittleren Ostens und Nordafrikas.

Fischlinie	Wildtyp-Linie „TÜ“, ZFIN: ZDB-GENO-990623-3
Bereitstellung	Fischzucht des Max-Planck-Instituts Tübingen
Systematik	Ordnung <i>Cypriniformes</i> , Familie der <i>Cyprinidae</i> , Stamm <i>Danio rerio</i> (Scheitza, 2013)
Verwendete Fischembryonen	<ul style="list-style-type: none"> • 48 hpf, mit Chorionhülle • 48 hpf, ohne Chorionhülle, mechanisch entfernt • 72 hpf, ohne Chorionhülle, geschlüpft

2.2 Bereitstellung von Zebrafischen

2.2.1 Haltung von Zebrafischen

Im Fischhaus des Max-Planck-Instituts in Tübingen werden ca. 170.000 Zebrafische nach den Vorgaben von Brand et al. (2002) gehalten. Die Sauberkeit des Wassers in den Aquarien ist von hoher Priorität, da Zebrafische empfindlich auf Giftstoffe z.B. aus den eigenen Ausscheidungen reagieren. Durch die Zirkulation des Wassers durch biologische Filter, auf deren Oberfläche Bakterien wachsen können, wird dieses gereinigt. Ein Aquarium mit einem Volumen von ca. 16 l dient der Haltung von max. 60 Fischen. Die Aquarien bestehen aus Glas. Ein engangender Deckel verhindert die Abwanderung der Zebrafische. Das Füttern der Fische erfolgt durch ein kleines Loch im Deckel mit einem maximalen Durchmesser von 1 cm. Im Max-Planck-Institut in Tübingen sind die Aquarien mit „Fischwasser“ befüllt. Dieses wird aus Leitungswasser, das über Aktivkohlefilter gereinigt wurde, und Wasser, das durch Revers-Osmose entsalzt wurde, gemischt. Die Wassertemperatur sollte zwischen 25 bis 28 °C liegen. Ein optimaler Tag-Nacht-Zyklus wird durch die Beleuchtung des Aquariums mit 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit am Tag erreicht. Täglich werden folgende,

festgelegte Wasserwerte überprüft: pH-Wert, Temperatur, Ammonium- und Nitratkonzentration, elektrischer Leitwert, Gesamthärte und Carbonat-Härte. Im Fischhaus des Max-Planck-Instituts werden pro Tag mindestens 10% der Wassermenge ausgetauscht. Die Fütterung mit einer Kombination aus Trocken- und Lebendfutter, meist *Artemia nauplia*, hält die Fische in guten Fortpflanzungsbedingungen. Die Anpassung der Futtermenge an die Fischdichte im jeweiligen Aquarium dämmt die Gefahr der Überfütterung ein (Brand et al., 2002).

2.2.2 Zucht und Verpaarung

Für die Gesundheit und Fertilität der Fische sind der pH-Wert und der Gehalt von Mineralstoffen im Wasser wichtig. Ein hoher Salzgehalt wirkt sich positiv auf das Wohlbefinden der Tiere aus, da das Bakterienwachstum reduziert und ein stabiler pH-Wert induziert wird. Ein niedriger Salzgehalt fördert die Fertilität der Zebrafische (Brand et al., 2002).

Die Verpaarung der Zebrafische erfolgt unter Sicht in gesonderten Paarungsbecken. Zunächst werden Männchen und Weibchen über Nacht in ein Paarungsbecken mit Trennwand gegeben. Am darauffolgenden Morgen wird für die Verpaarung die Trennwand entfernt. Die Eiablage findet nach ca. 5 bis 15 Minuten statt. Durch diese Methode ist das mögliche Zeitfenster der Befruchtung klein und das Abschätzen des Alters der Fischembryonen kann präzise eingeschätzt werden. Ein Weibchen kann bis zu 800 Eier, im Schnitt etwa 200 bis 300 Eier, legen. Der Boden der Paarungsboxen ist mit Gittereinsätzen versehen, die die gelegten Eier vor dem Fraß durch die Elterntiere schützen. Dort werden sie mithilfe eines Teesiebs aus Plastik eingesammelt und in Petrischalen mit Embryo-2-Medium (E2-Medium) überführt.

Die Fischembryonen werden bis zur Abholung bei 29 °C in den Petrischalen im Brutschrank belassen. Eine Fütterung der Embryonen ist nicht notwendig, da die Ernährung durch ihren Dottervorrat gewährleistet ist (Brand et al., 2002).

2.2.3 Transport und Inkubation der Fischembryonen

Die Fischembryonen wurden in einem Alter von 48 Stunden nach Befruchtung (48 hpf) im Max-Planck-Institut abgeholt. Für den ca. 20-minütigen Transport ins Elektromikroskop-Labor der Hautklinik Tübingen wurden die Fischembryonen mithilfe von Pasteur-Pipetten aus den Petrischalen in Falcon-Tubes mit ausreichend E2-Medium umgesetzt. Die Falcon-Tubes wurden für einen sicheren Transport in eine Styroporbox gestellt. Zusätzliche Wärmepacks in der Styroporbox stellten in den Wintermonaten Oktober bis Januar eine optimale Temperatur von mindestens 28 °C für den 20-minütigen Transport sicher.

Anschließend wurden die Fischembryonen erneut in Petrischalen mit E2-Medium umgesetzt und mit geschlossenem Deckel inkubiert. Die Inkubationsbedingungen entsprachen den Vorgaben des Max-Planck-Instituts, wobei eine Temperatur von 29 °C im Brutschrank sichergestellt wurde.

2.3 Fischembryonen-Entwicklung

Innerhalb von 48 Stunden entwickeln die Zebrafisch-Oocyten alle Organe des adulten Zebrafisches (Kimmel et al., 1995). Während dieser Entwicklung befinden sich die Zebrafischembryonen innerhalb des Chorions, einer schützenden Eihülle. Etwa 72 hpf schlüpfen die Zebrafischembryonen aus der Chorionhülle (Westerfield, 1995). Die OECD-Leitlinien sehen die Beobachtung von Fischembryonen bis 96 hpf vor (OECD, 2013). Dieser Zeitraum wurde eingehalten.

2.4 Exposition von Fischembryonen mit Veninen

2.4.1 Vorgehensweise

Die LC50-Konzentration bezeichnet die mittlere letale Konzentration einer chemischen Substanz mit einer Überlebensrate von 50% der ausgesetzten Population (Schulte and Nagel, 1994). Zur Ermittlung der mittleren letalen Konzentration LC50 wurden Fischembryonen in E2-Medium auf 96-Well-Mikrotiterplatten pipetiert und mit den fünf Veninen in verschiedenen Verdünnungsreihen versetzt. Die Letalitätsrate wurde nach 24 Stunden erfasst. Zusätzlich erfolgte eine

Beobachtung der Fischembryonen direkt nach Giftzugabe, nach 30 Minuten, einer Stunde, sowie zwei Stunden, bei Bedarf zusätzlich nach drei und fünf Stunden.

2.4.2 Herstellen der Stammlösung

Zum Lösen der Schlangengifte wurde PBS-Puffer (engl. Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung) eingesetzt. Nach Abziehen des Metallverschlusses wurden der Giftampulle mit einer BD-Plastikpak-Tuberkulinspritze und dazugehöriger Injektionskanüle schrittweise 1000 µl PBS-Puffer zugegeben. Das Gift wurde vollständig gelöst und eine homogene Flüssigkeit hergestellt. Diese Lösung diente, mit einer Konzentration von 100.000 ng/µl, als Stammlösung zur Herstellung der Verdünnungsreihen.

2.4.3 Verdünnungsreihen

Je nach Anzahl der Verdünnungsstufen wurden Eppendorf-Tubes mit den zugehörigen Nummern beschriftet. Mithilfe einer BD-Plastikpak-Tuberkulinspritze und dazugehöriger Injektionskanüle wurde Stammlösung in das erste Eppendorf-Tube der Verdünnungsreihe pipettiert. Nach Auffüllen mit E2-Medium wurde das Venin-E2-Gemisch gevortext. Dieses Gemisch diente als Basis für die nächste Verdünnungsstufe. Je nach Art der Verdünnungsreihe wurde dieser Vorgang vier bis zehn Mal wiederholt. Bis zum Gebrauch wurde die Verdünnungsreihe im Kühlschrank gelagert.

Zur Berechnung der Konzentrationen der Verdünnungsreihen wurde folgende Formel verwendet: $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$, wobei c_1 und V_1 jeweils Konzentration und Volumen der zur Verdünnung verwendeten Lösung angeben und c_2 und V_2 jene der entstandenen Verdünnungsstufe.

2.4.3.1 Log-Stufen

Tabelle 1 zeigt den Aufbau der logarithmischen Verdünnungsreihe, sowie die Endkonzentrationen auf der Mikrotiterplatte.

Tabelle 1: Logarithmische Verdünnungsreihe der Venine

Verdünnungsstufe	c ₁ (ng/μl)	Verdünnung	V ₁ (μl)	V ₂ (μl)	c ₂ (ng/μl)	Endkonzentration (ng/μl)
1	100.000	1:5	200	1.000	20.000	10.000
2	20.000	1:10	100	1.000	2.000	1.000
3	2.000	1:10	100	1.000	200	100
4	200	1:10	100	1.000	20	10
5	20	1:10	100	1.000	2	1
1A	20.000	1:4	75/225	300	5.000	2.500
1B	20.000	1:2	150/150	300	10.000	5.000
1C	20.000	4:1	225/75	300	15.000	7.500
2A	2.000	1:4	75/225	300	500	250
2B	2.000	1:2	150/150	300	1.000	500

Für die erste Konzentration der Verdünnungsreihe wurde eine 1:5-Verdünnung der Stammlösung angefertigt. Diese setzte sich aus 200 μl der Stammkonzentration und 800 μl E2-Medium zusammen. Die Konzentration 1 der Verdünnungsreihe wurde wie folgt berechnet: $20.000 \text{ ng/}\mu\text{l} = 200 \mu\text{l} \times 100.000 \text{ ng/}\mu\text{l} / 1.000 \mu\text{l}$. Die zweite Verdünnungsstufe wurde durch eine 1:10 Verdünnung der Konzentration 1 hergestellt, sodass eine Konzentration von 2.000 ng/μl vorlag. Durch Wiederholung der oben beschriebenen Schritte ergaben sich die logarithmischen Verdünnungsstufen 3 bis 5, wobei die Konzentration 3 200 ng/μl, die Konzentration 4 20 ng/μl und die Konzentration 5 2 ng/μl betrug.

Bei einzelnen Versuchen wurden zusätzliche Zwischenstufen hergestellt, um mit hoher Genauigkeit ein Ergebnis zu erzielen. Jeweils drei Zwischenstufen A, B und C wurden zwischen den Verdünnungsstufen 1 und 2, und den Verdünnungsstufen 2 und 3 eingefügt. Zur Herstellung der Verdünnungsstufen 1A und 2A wurden jeweils 75 μl aus den Verdünnungsstufen 1 bzw. 2 sowie 225 μl E2-Medium verwendet. Die Konzentration 1A wurde mit 5.000 ng/μl ($75 \mu\text{l} \times 20.000 \text{ ng/}\mu\text{l} / 300 \mu\text{l}$) und die Konzentration 2A mit 500 ng/μl berechnet. Die Verdünnungsstufen 1B und 2B setzten sich aus 150 μl der Verdünnungsstufen 1 bzw. 2 und

150 µl E2-Medium zusammen. Damit ergaben sich die Konzentration 10.000 ng/µl für die Verdünnungsstufe 1B und 1.000 ng/µl für die Verdünnungsstufe 2B. Für die Zwischenstufen 1C und 2C wurden 225 µl der Verdünnungsstufe 1 bzw. 2 mit 75 µl E2-Medium gemischt, um Konzentrationen von 15.000 ng/µl bzw. 1.500 ng/µl zu erreichen.

Bei Zugabe von 50 µl der einzelnen Verdünnungsstufen in die, bereits mit einem Fischembryo in 50 µl E2-Medium befüllten Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte, wurden folgende Endkonzentrationen für die Verdünnungsstufen 1 bis 5 (10.000 ng/µl, 1.000 ng/µl, 100 ng/µl, 10 ng/µl und 1 ng/µl) sowie die Zwischenstufen 1A bis 2C (2.500 ng/µl, 5.000 ng/µl, 7.500 ng/µl, 250 ng/µl, 500 ng/µl, 750 ng/µl) des Giftes auf der Mikrotiterplatte erreicht.

2.4.3.2 Halbierende Verdünnungsreihe

Ausgehend von der Stammlösung mit einer Konzentration von 100.000 ng/µl wurden halbierende Verdünnungsreihen in folgenden Verdünnungsschritten: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 und 1:256 hergestellt (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Halbierende Verdünnungsreihe der Venine

Verdünnungsstufe	c ₁ (ng/µl)	Verdünnung	V ₁ (µl)	V ₂ (µl)	c ₂ (ng/µl)	Endkonzentration (ng/µl)
1	100.000	1:4	250	1.000	25.000	12.500
2	25.000	1:2	500	1.000	12.500	6.250
3	12.500	1:2	500	1.000	6.250	3.125
4	6.250	1:2	500	1.000	3.125	1.562,5
5	3.125	1:2	500	1.000	1.562,5	781,25
6	1.562,5	1:2	500	1.000	781,25	390,625
7	781,25	1:2	500	1.000	390,625	195,313

Eine Konzentration von 25.000 ng/µl wurde in der ersten Verdünnungsstufe erzielt. Für die nachfolgenden Konzentrationen wurde jeweils die Hälfte des Volumens der vorherigen Verdünnungsstufe zu gleichen Teilen mit E2-Medium gemischt. Die Endkonzentrationen der Stufen 1 bis 7 wurden durch Aufbringen von 50 µl der Giftlösung, in die bereits mit einem Fischembryo und 50 µl E2-Medium

bestückten Wells auf der Mikrotiterplatte, erreicht. Beim Versuch mit dem Gift der *Naja naja* wurde die Anzahl der Verdünnungsstufen um weitere fünf erhöht.

2.4.4 Auswahl der Fischembryonen

In Anlehnung an die Vorgehensweise von Chan et al. (2017) wurde für den ersten Versuch mit dem Gift der *Crotalus atrox* bei Fischembryonen, mit einem Alter von 48 hpf, die Chorionhülle mechanisch mit einer Pinzette entfernt. Der Zeitaufwand und das Verletzungsrisiko für die Fischembryonen erwiesen sich als hoch. Im Folgeversuch mit dem Gift der *Crotalus atrox* wurden Fischembryonen (48 hpf) mit und ohne Chorionhülle (mechanisch entfernt) eingesetzt und Unterschiede in der Letalität beobachtet. Um einheitliche Bedingungen für den Versuchsaufbau zu gewährleisten, wurde in den nachfolgenden Versuchen mit Fischembryonen 72 hpf gearbeitet, die bereits selbstständig aus der Chorionhülle geschlüpft waren.

Nach der Auswahl geschlüpfter und gut entwickelter Embryonen unter dem Mikroskop, erfolgte die Pipettierung je einer Larve mit 50 µl E2-Medium auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte. Zur Minimierung des Verletzungsrisikos der Fischembryonen wurde das vordere Drittel der Pipettenspitze, zur Vergrößerung der Öffnung, glatt abgetrennt.

2.4.5 Auswahl des Kontrollmediums

Das Kontrollmedium für alle nachfolgenden Versuche wurde im Erstversuch des Giftes *Crotalus atrox* festgelegt. Vier Kontrollgruppen mit je sechs Wells und jeweils einem Fischembryo ohne Chorionhülle wurden mit den Medien PBS-Puffer, E2-Medium, Aqua und Natriumchlorid (0,9%) eingesetzt. Keines der Medien führte zu Einschränkungen der Vitalfunktionen oder zum Tod der Fischembryonen. Aufgrund der Eignung als Transport- und Lagermedium für Zebrafischembryonen wurde das E2-Medium als Kontrollmedium für alle weiteren Versuche festgelegt.

2.4.6 Aufbringen der Venin-Verdünnungsreihen

Der genaue Aufbau der Mikrotiterplatten variierte in den Versuchen, das Grundschema blieb identisch. Die Anordnung der Verdünnungsstufen auf der Mikrotiterplatte erfolgte nach festen Regeln. Eine Verdünnungsstufe wurde mit der Anzahl der benötigten Wells, welche zwischen vier und zwölf differierte, waagrecht angeordnet. Kontrollfelder mit Kontrollmedium, ebenfalls mit einer Anzahl von vier bis zwölf Wells, wurden in die unterste Reihe der Mikrotiterplatte gesetzt. In die bereits mit Fischembryonen und 50 µl E2-Medium bestückten Wells wurden die Giftlösungen in verschiedenen Konzentrationen aufgebracht.

Im Anschluss wurden die Mikrotiterplatten zur gleichmäßigen Verteilung des Schlangengiftes für 10 Minuten auf den Rüttler gestellt. Unter dem Mikroskop wurde die Letalität der einzelnen Konzentrationen, bezogen auf die Zeit nach Exposition, erhoben. Fischembryonen ohne Herzschlag, ohne Bewegung (OECD, 2013) und ohne Zirkulation wurden als letal eingestuft. Zusätzlich zur Abschlusskontrolle, 24 Stunden nach Exposition, wurde die Letalität in den ersten zwei Stunden halbstündlich, danach stündlich für weitere drei Stunden observiert und das Ergebnis schriftlich festgehalten.

Zur Gewährleistung einer exakten Konzentrationsbestimmung und zur Berechnung der Varianz wurde jeder Versuch zwei bis drei Mal wiederholt. Die Versuche und ihre Wiederholungen waren zur Herstellung der Vergleichbarkeit analog aufgebaut.

2.4.7 Modifizierter LC50 Versuch bei *Bitis arietans*

Beim Lösen des Giftes *Bitis arietans* für die LC50-Versuche entstand eine stark getrübe Lösung. Im Wiederholungsversuch wurde zur Klärung der Lösung Tween20 hinzugegeben. In einem Vorversuch wurde die Toxizität von Tween20 für Fischembryonen in unterschiedlichen Konzentrationen ermittelt.

2.4.7.1 Toxizität Tween20

Die Wirkung von Tween20 wurde in fünf verschiedenen Konzentrationen getestet. Der Hersteller empfiehlt eine Tween20-Konzentration von 0,05%. Hierzu wurden 500 µl Tween20 mit 1000 ml PBS-Puffer gemischt.

Nach Anfertigung der, in Tabelle 3 dargestellten, Konzentrationen (c_2) wurden pro Konzentration auf der Mikrotiterplatte vier Wells mit je zwei Fischembryonen und 50 µl befüllt.

Tabelle 3: Verdünnungsreihe Tween20

Verdünnungsstufe	c_1 (%)	V_1 (µl)	V_2 (ml)	c_2 (%)	Endkonzentration (%)
1	100	5	1	0,5	0,25
2	100	5	5	0,1	0,05
3	100	5	10	0,05	0,025
4	0,05	500	5	0,005	0,0025
5	0,005	500	5	0,0005	0,00025

Die Wirkung auf die Fischembryonen wurde engmaschig kontrolliert. Die Konzentration 0,05% war nach zwölf Stunden die höchste nicht toxische Konzentration (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Toxizität Tween20

Tween20-Konzentrationen	Überlebensrate nach 12 Stunden
0,5%	0%
0,1%	0%
0,05%	100%
0,005%	100%
0,0005%	100%

2.4.7.2 Verdünnungsreihe *Bitis arietans* mit Tween20

Nach Herstellung von 800 µl einer 0,05-prozentigen Tween20-Lösung wurden 200 µl Stammlösung des Venins *Bitis arietans* hinzugeben, wodurch eine Veninkonzentration von 20.000 ng/µl erzielt wurde. Die Tween20-Konzentration sank auf 0,04%. Nach Lösung des Giftes der *Bitis arietans* mit 0,05-prozentiger Tween20-PBS-Puffer-Lösung lag die Stammlösung wie gewünscht als klare

Flüssigkeit vor. Für die weiteren Verdünnungsstufen wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe, mit der Verdünnung 1:10, angefertigt (s. Tabelle 5). Zwischen der ersten und zweiten Verdünnungsstufe wurden wie unter 2.4.3.1. beschrieben drei Zwischenstufen eingefügt.

Tabelle 5: Verdünnungsreihe des Venins der *Bitis arietans* mit Tween20

Verdünnungsstufe	c ₁ (ng/µl)	Verdünnung	V ₁ (µl)	V ₂ (µl)	c ₂ (ng/µl)	Endkonzentration (ng/µl)
1	100.000	1:5	200	1.000	20.000	10.000
1A	20.000	4:1	225/75	300	15.000	7.500
1B	20.000	1:2	150/150	300	10.000	5.000
1C	20.000	1:4	75/225	300	5.000	2.500
2	20.000	1:10	100	1.000	2.000	1.000
3	2.000	1:10	100	1.000	200	100

Das Tween20-Venin-Gemisch wurde anschließend für eine Stunde auf den Rüttler gestellt. Für die Kontrollgruppen wurde eine 0,04-prozentige Tween20-Lösung hergestellt, um die Toxizität dieser Lösung zu überprüfen.

2.5 Exposition der Fischembryonen mit Venin und Antivenin

2.5.1 Ziel der Versuche

Am Beispiel des Giftes der ägyptischen Kobra (*Naja haje*) und dem korrespondierenden Antivenin PSASA wurde eine Versuchsreihe nach WHO-Standards zur Ermittlung der EC50-Konzentration angefertigt. Als EC50-Konzentration wird die Antiveninkonzentration bezeichnet, bei der 50% der Fischembryonenpopulation trotz Exposition mit einer dreifachen LC50-Konzentration überleben. Entsprechend der aus den vorangegangenen Versuchen ermittelten LC50-Konzentration für das Gift der *Naja haje*, wurde die zu neutralisierende Zielkonzentration als dreifache LC50-Konzentration mit 1.053,3 ng/µl festgelegt.

2.5.2 Lyophilisiertes Antivenin

2.5.2.1 Lyophilisierung

Zur Bestimmung der Masse in Gramm des in der Lösung enthaltenen Antivenins wurden 10 ml flüssiges Antivenin zu Pulver lyophilisiert. Nach der vollständigen Lyophilisation wurde, nach Abzug des Leergewichts des Falcon-Tubes (Leergewicht: 13,0322 g), die Menge an PSASA in Gramm bestimmt (0,2678 g). Im Anschluss konnte, durch Zugabe von E2-Medium, eine beliebige Konzentration des Antivenins hergestellt werden.

2.5.2.2 Überprüfung der Toxizität des lyophilisierten Antivenins

Eine gesättigte Lösung des lyophilisierten Antivenins wurde durch Zugabe von 1100 µl E2-Medium erreicht. Diese stellte, mit einer Konzentration von 243,5 µg/µl (0,2678 g / 1100 µl), die erste Verdünnungsstufe dar. Vier weitere Konzentrationen wurden in einer logarithmischen 1:10 Verdünnung angefertigt (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Logarithmische Verdünnungsreihe des lyophilisierten Antivenins

Verdünnungsstufe	c ₁ (µg/µl)	Verdünnung	V ₁ (µl)	V ₂ (µl)	c ₂ (µg/µl)
1	243,5	-	-	-	243,5
2	243,5	1:10	7,5	75	24,35
3	24,35	1:10	7,5	75	2,435
4	2,435	1:10	7,5	75	0,2435
5	0,2435	1:10	7,5	75	0,02435

Zur Überprüfung der Toxizität des lyophilisierten Antivenins wurden pro Konzentration und für die Kontrollgruppe jeweils zwei Wells auf der Mikrotiterplatte verwendet. Jedes Well wurde mit zwei Fischembryonen und insgesamt 50 µl E2-Medium versetzt.

2.5.2.3 EC50-Versuch

Die unter 2.5.2.2. aufgeführte logarithmische Verdünnungsreihe des lyophilisierten Antivenins wurde erneut hergestellt. Um die zu neutralisierende Zielkonzentration des Venins von 1.053,3 ng/μl annähernd in dem Antivenin-Venin-Gemisch zu erreichen, wurden in einem ersten Schritt jeweils 72,75 μl der fünf Antiveninkonzentrationen mit je 2,25 μl der Venin-Stammlösung (Konzentration 100.000 ng/μl) gemischt (siehe Abb. 1).

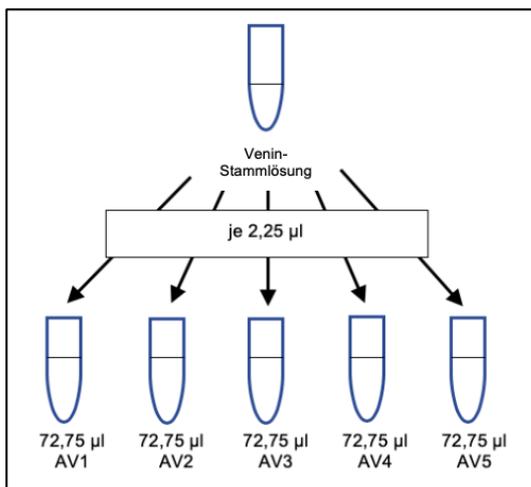


Abb. 1: Mischverhältnis Venin und lyophilisiertes Antivenin (AV) des EC50-Versuches

$c_{\text{Venin-Stammlösung}}: 100.000 \text{ ng}/\mu\text{l}$

$c_{\text{AV1}}: 243,5 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $c_{\text{AV2}}: 24,23 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $c_{\text{AV3}}: 2,435 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $c_{\text{AV4}}: 0,2435 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $c_{\text{AV5}}: 0,02435 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Durch dieses Mischverhältnis wurde zunächst eine Veninkonzentration von 3.000 ng/μl hergestellt. Nach einer Inkubationszeit des Antivenin-Venin-Gemischs von 30 Minuten wurden die Wells mit je zwei Fischembryonen in 50 μl E2-Medium und 25 μl Antivenin-Venin-Gemisch befüllt. So wurde bei variierenden Antiveninkonzentrationen stets eine Endkonzentration des Venins von 1.000 ng/μl sichergestellt (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Herstellung der Endkonzentration des Venins der *Naja haje*

c_1 (ng/μl)	V_1 (μl)	V_2 (μl)	c_2 (ng/μl)	Endkonzentration (ng/μl)
100.000	2,25	75	3.000	1.000

2.5.3 Unbehandeltes Antivenin

2.5.3.1 EC50-Versuch

Da sich zeigte, dass eine Konzentrierung des Antivenins durch Lyophilisierung zu einer Übersterblichkeit der Fische führte, wurde für die nächsten Versuche die ursprüngliche, bereits gelöste Form des Antivenins benutzt. Es wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe aus dem unbehandelten Antivenin hergestellt. Die Konzentration von 26,78 µg/µl (0,2678 g in 10 ml) des flüssigen Antivenins aus der Ampulle stellte die erste Verdünnungsstufe dar (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Logarithmische Verdünnungsreihe des unbehandelten Antivenins

Verdünnungsstufe	C ₁ (µg/µl)	Verdünnung	V ₁ (µl)	V ₂ (µl)	C ₂ (µg/µl)
1	26,78	-	-	75	26,78
2	26,78	1:10	7,5	75	2,678
3	2,678	1:10	7,5	75	0,2678
4	0,2678	1:10	7,5	75	0,02678
5	0,02678	1:10	7,5	75	0,002678

Die Vorbereitung der Mikrotiterplatte mit den Fischembryonen und das anschließende Aufbringen des Antivenin-Venin-Gemischs auf die Mikrotiterplatte erfolgte analog zu dem unter 2.5.2.3. dargestellten Aufbau.

2.5.3.2 Modifikationen des EC50-Versuches

Da in den vorausgegangenen Versuchen bei dreifacher LC50-Konzentration, trotz der Verabreichung von fünf Antiveninkonzentrationen, kein Neutralisationseffekt festzustellen war, wurde ein modifizierter Versuchsaufbau gewählt. Es wurde neben der Antivenin-Verdünnungsreihe eine Verdünnungsreihe des Venins hergestellt. Beide Verdünnungsreihen wurden in Form von logarithmischen Verdünnungsreihen, 1:10, mit jeweils fünf Verdünnungsstufen, angefertigt.

Für die Verdünnungsreihe des Giftes der *Naja haje* wurden zunächst 120 µl der Stammlösung (aus der Giftampulle) mit 180 µl E2-Medium vermischt. Eine Giftkonzentration von 40.000 ng/µl (120 µl x 100.000 ng/µl / 300 µl) wurde als erste

Verdünnungsstufe hergestellt und gevortext. Nach Entnahme von 30 µl und Zugabe von 270 µl E2-Medium wurde die zweite Verdünnungsstufe einer Konzentration von 4.000 ng/µl ($30 \mu\text{l} \times 40.000 \text{ ng}/\mu\text{l} / 300 \mu\text{l}$) erzielt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis fünf Verdünnungsstufen vorlagen (s. Tabelle 9). Die Endkonzentrationen des Venins auf der Mikrotiterplatte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Logarithmische Verdünnungsreihe des Venins der *Naja haje*

Verdünnungsstufe	c ₁ (ng/µl)	Verdünnung	V ₁ (µl)	V ₂ (µl)	c ₂ (ng/µl)	Endkonzentration (ng/µl)
1	100.000	1:2,5	120	300	40.000	13.300
2	40.000	1:10	30	300	4.000	1.330
3	4.000	1:10	30	300	400	133
4	400	1:10	30	300	40	13,3
5	40	1:10	30	300	4	1,33

Für die Verdünnungsreihe des Antivenins stellte das unbehandelte Antivenin aus der Ampulle die erste Verdünnungsstufe dar (26,78 µg/µl). Für die folgenden Verdünnungsstufen wurden auch hier jeweils 30 µl aus der vorherigen Verdünnungsstufe entnommen, mit 270 µl E2-Medium vermischt und gevortext ($30 \mu\text{l} \times 26,78 \mu\text{g}/\mu\text{l} / 300 \mu\text{l}$).

Die fünf Antiveninkonzentrationen wurden in waagerechten Reihen mit jeweils zehn Wells auf der Mikrotiterplatte verteilt. Pro Verdünnungsstufe des Venins wurden zwei senkrechte Spalten mit je fünf Wells angeordnet (s. Abb. 2).

	C _{Venin 1}		C _{Venin 2}		C _{Venin 3}		C _{Venin 4}		C _{Venin 5}	
<u>CAV 1</u> →	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<u>CAV 2</u> →	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<u>CAV 3</u> →	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<u>CAV 4</u> →	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<u>CAV 5</u> →	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abb. 2: Verteilung der Verdünnungsstufen des Venins und des unbehandelten Antivenins (AV) auf der Mikrotiterplatte

C_{Venin 1}: 13.300 ng/µl, C_{Venin 2}: 1.330 ng/µl, C_{Venin 3}: 133 ng/µl, C_{Venin 4}: 13,3 ng/µl, C_{Venin 5}: 1,33 ng/µl

CAV 1: 26,78 µg/µl, CAV 2: 2,678 µg/µl, CAV 3: 0,2678 µg/µl, CAV 4: 0,02678 µg/µl, CAV 5: 0,002678 µg/µl

Pro Well wurden 25 µl des Antivenins und 25 µl des Venins aufgebracht und 30 Minuten inkubiert. Die Fischembryonen wurden mit 25 µl E2-Medium eingesetzt. Für die Kontrollgruppen wurden Fischembryonen mit 50 µl E2-Medium und 25 µl Venin bzw. 25 µl Antivenin oder 25 µl E2-Medium hinzugefügt. Dieser Versuch wurde wiederholt.

2.5.4 Auswahl und Einsetzen der Fischembryonen auf die Mikrotiterplatte

Auch für diese Versuche kamen ausschließlich gut entwickelte Fischembryonen (72 hpf) zum Einsatz. Pro Well wurden, je nach Versuchsaufbau, ein oder zwei Fischembryonen mit insgesamt 25 oder 50µl E2-Medium eingesetzt.

2.5.5 Aufbringen der Antivenin-Verdünnungsreihe

Ähnlich zu den LC50-Versuchen variierte auch hier der genaue Aufbau der Mikrotiterplatten zwischen den Versuchen; das Grundschema blieb identisch.

Je nach Versuch wurde die Wirkung des Antivenins, sowie die Neutralisationskapazität des Antivenins untersucht.

2.5.6 PH-Wert-Messung und Zusammensetzung des Antivenins

Zur Klärung der Fragestellung eines toxischen Effekts des pH-Wertes des Antivenins wurde dieser bestimmt. Neben der pH-Wert-Messung des polyvalenten Antivenins wurde ebenfalls der pH-Wert einer Verdünnung des Giftes der *Naja haje* (50µl Stammlösung mit 2 ml E2-Medium) sowie des E2-Mediums ermittelt.

Die Zusammensetzung des Antivenins und eine mögliche toxische Wirkung der Trägerstoffe für Fischembryonen wurde anhand des Beipackzettels des verwendeten Antivenins geprüft.

2.6 Analyse der Fischembryonen unter dem Mikroskop

Die Analyse der Fischembryonen nach Giftexposition erfolgte unter dem ZEISS Stemi 508 Mikroskop mit Mikroskopkamera (Axiocam 105 color). Mikroskopiert wurde von grob nach fein. Durch Drehen des Objektivrevolvers und Einstellung der nächsten Vergrößerungsstufe, wurde die genauere Betrachtung der Fischembryonen möglich. Die Vergrößerungen des Stemi 508 Mikroskops setzen sich aus der Objektiv-Vergrößerung und dem Optovar zur Feineinstellung der Vergrößerung zusammen. Daraus ergeben sich Vergrößerungen von 6,3x; 8x; 10x; 12,5x; 16x; 20x; 25x; 32x; 40x; 50x.

Zur Feststellung der Letalität wurden die Kriterien fehlender Herzschlag, fehlende Bewegung und fehlende Zirkulation herangezogen. Folgende Kriterien zur Beurteilung der subletalen Toxizität wurden erfasst: Herzschlag, Zirkulation, spontane Bewegung und unkontrollierte Zuckungen. Zusätzlich wurde das Erscheinungsbild letaler Fischembryonen beobachtet. Saumbildung und Krümmung des Körpers der Fischembryonen (s. Abb. 5), sowie ein Zersetzungsprozess und ein Verlust der Pigmentierung (s. Abb. 6) wurden als Kriterien herangezogen. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen im Vergleich regelhaft entwickelte Fischembryonen (72 hpf).

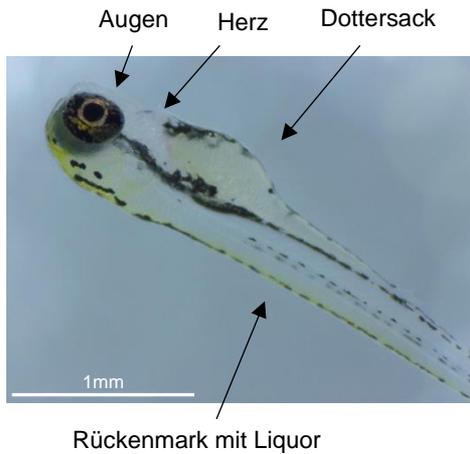


Abb. 3: FE, 72 hpf, regelhafte Entwicklung von Augen, Herz, Dottersack und Rückenmark



Abb. 4: FE, 72 hpf, regelhafte Entwicklung der Brustflossen

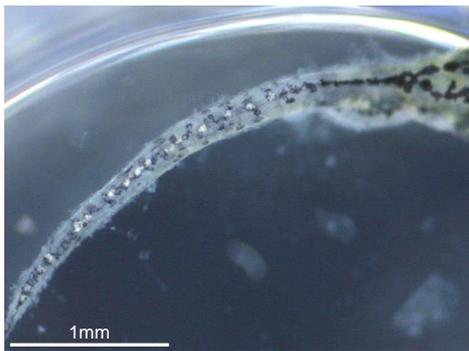


Abb. 5: Saumbildung und Krümmung letaler FE



Abb. 6: Zersetzungsprozess und Verlust Pigmentierung letaler FE

Beobachtet wurden die akute Wirkung der jeweiligen Giftkonzentration direkt nach Giftzugabe, die Veränderungen im Verlauf zu den Beobachtungszeitpunkten 30 Minuten, eine Stunde und zwei Stunden, bei Bedarf darüber hinaus 3 und 5 Stunden nach Giftzugabe und schließlich das Endergebnis nach 24 Stunden.

2.7 Entsorgung der verwendeten Materialien

Zur Denaturierung des Schlangengiftes und zur Abtötung der Fischembryonen wurde Formaldehyd verwendet. Mithilfe von Pasteur-Pipetten wurden die Fischembryonen von den verwendeten Mikrotiterplatten und aus den Petrischalen, sowie das Schlangengift aus den Eppendorf-Tubes der Verdünnungsreihen in ein Becherglas pipettiert und Formaldehyd hinzugegeben. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 30 Minuten wurde das Gemisch als Sondermüll entsorgt.

2.8 Statistische Methoden

Die Datenerhebung erfolgte mit Microsoft Excel Version 16.35 (Microsoft, Redmond, USA). Tabellen mit der Anzahl der letalen Fischembryonen unter den einzelnen Gift- sowie Antiveninkonzentrationen zu den festgelegten Beobachtungszeitpunkten, sowie der jeweiligen Letalitätssrate in Prozent wurden angefertigt. Aus den erhobenen Daten wurden Überlebenszeit-Analysen nach der Kaplan-Meier-Methode erstellt. Zur Erstellung der Abbildungen wurde das Programm Graph Prism verwendet. Auf der x-Achse wurde die Zeit in Stunden, auf der y-Achse die Überlebensrate in Prozent aufgetragen. Konzentrationen, die über den Beobachtungszeitraum zu einer gleichen Überlebensrate führten, wurden in einer Kurve zusammengefasst. Die Überlebensrate (\ddot{U}_R) in Prozent ist die Differenz von 100% und der Letalitätssrate (L_R) in %: $\ddot{U}_R = 100\% - L_R$.

Die statistische Auswertung der LC50- und EC50-Konzentrationen erfolgte mit der Statistik-Software IBM SPSS Statistics Version 25 (Version 25.0, SPSS, Chicago, IL, USA). Zur Analyse der LC50-Konzentrationen mit 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) wurde eine Probit-Regressionsanalyse verwendet. Zur Überprüfung der Anpassung und Reproduzierbarkeit erfolgte die Berechnung von p-Wert, Hazard Ratio (HR) mit 95%-KI und dem Chi-Quadrat-Test. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Überlebenszeitanalysen nach Exposition mit fünf Veninen

Abbildung 7 zeigt die Überlebensraten der logarithmischen Verdünnungsreihe, Konzentrationen 10.000 ng/μl bis 1 ng/μl, für das Gift der *Crotalus atrox*. Direkt nach Giftzugabe wurde für die Konzentration 10.000 ng/μl eine Überlebensrate von 8,4% beobachtet, nach 30 Minuten lag diese bei 0%. Unter der Konzentration 7.500 ng/μl überlebten 30 Minuten nach Giftzugabe 25% der Fischembryonen, nach einer Stunde wurde eine Überlebensrate von 0% beobachtet. Bei der Konzentration 5.000 ng/μl lag die Überlebensrate nach drei Stunden bei 100%, nach 24 Stunden bei 25%. Die Konzentrationen 2.500 ng/μl bis 1 ng/μl führten nicht zum Tod der Fischembryonen. Die Fischembryonen der Kontrollgruppen wiesen zu keinem Zeitpunkt Anzeichen einer Einschränkung der Vitalfunktionen auf.

Aus dem Gift der *Naja naja* wurde zunächst eine halbierende Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 12.500 ng/μl bis 195,313 ng/μl angefertigt. Bei allen Konzentrationen lag die Überlebensrate nach 30 Minuten bei 0%.

Abbildung 8 zeigt die Überlebensraten der erweiterten halbierenden Verdünnungsreihe des Giftes der *Naja naja*. Die Konzentration 97,656 ng/μl war direkt nach Giftzugabe zu 100% letal. Nach 30 Minuten war die Konzentration 48,828 ng/μl für alle sechs Fischembryonen tödlich. Unter der Konzentration 24,414 ng/μl wurde nach einer Stunde eine Überlebensrate von 100%, nach 24 Stunden von 16,6% beobachtet. Die Überlebensrate der Konzentrationen 12,207 ng/μl bis 0,003 ng/μl und der Kontrollgruppe lag im Beobachtungszeitraum bei 100%.

Abbildung 9 zeigt die Überlebensraten einer logarithmischen Verdünnungsreihe des Giftes der *Vipera ammodytes* für Konzentrationen von 10.000 ng/μl bis 1 ng/μl.

Hohe Konzentrationen bis 2.500 ng/μl waren, wie in Abbildung 9 ersichtlich, für alle Fischembryonen nach 30 Minuten letal (Überlebensrate 0%). Die Konzentrationen 1.000 ng/μl bis 1 ng/μl führten innerhalb der ersten zwei Stunden zu

keiner Letalität. Nach 24 Stunden lag die Überlebensrate der Konzentrationen 1.000 ng/μl und 750 ng/μl bei 0%, bei der Konzentration 500 ng/μl bei 50% und bei 250 ng/μl bei 83,3%. Die Konzentrationen 100 ng/μl bis 1 ng/μl waren nach 24 Stunden nicht letal. Die Kontrollgruppe zeigte, mit einer Überlebensrate von 100%, zu keinem Beobachtungszeitpunkt Anzeichen einer Einschränkung der Vitalfunktionen.

Abbildung 10 stellt die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse von Fischembryonen nach Exposition mit dem Gift der *Naja haje* in einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 10.000 ng/μl bis 100 ng/μl dar. Die Konzentrationen 10.000 ng/μl bis 2.500 ng/μl wiesen direkt nach Giftzugabe eine Überlebensrate von 0% auf. Die Überlebensrate unter der Konzentration 1.000 ng/μl betrug nach 30 Minuten 50%, nach einer Stunde 0%. Bei der Konzentration 100 ng/μl und der Kontrollgruppe lag 24 Stunden nach Giftzugabe die Überlebensrate bei 100%.

Abbildung 11 zeigt die Überlebenszeitanalyse der logarithmischen Verdünnungsreihe des Giftes *Bitis arietans*, zwei Stunden nach Giftzugabe war für alle Konzentrationen eine Überlebensrate von 100% zu beobachten. Die Fischembryonen waren uneingeschränkt vital. 24 Stunden nach Giftzugabe wiesen die Konzentrationen 10.000 ng/μl und 7.500 ng/μl eine Überlebensrate von 0% auf. Die Überlebensrate der Konzentration 5.000 ng/μl betrug nach 24 Stunden 25%. Die Konzentrationen 2.500 ng/μl bis 100 ng/μl führten auch nach 24 Stunden nicht zur Letalität.

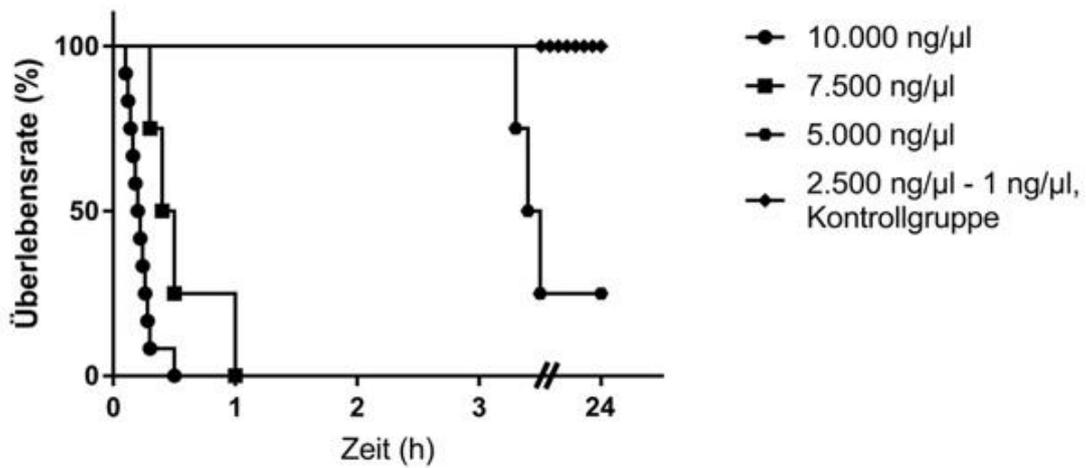


Abb. 7: Überlebenszeitanalyse logarithmische Verdünnungsreihe (in ng/µl) *Crotalus atrox* (je 12 FE aus Chorionhülle entfernt, 48 hpf) mit Zwischenstufen (je 4 FE aus Chorionhülle entfernt, 48 hpf). Versuch 1 von 3.

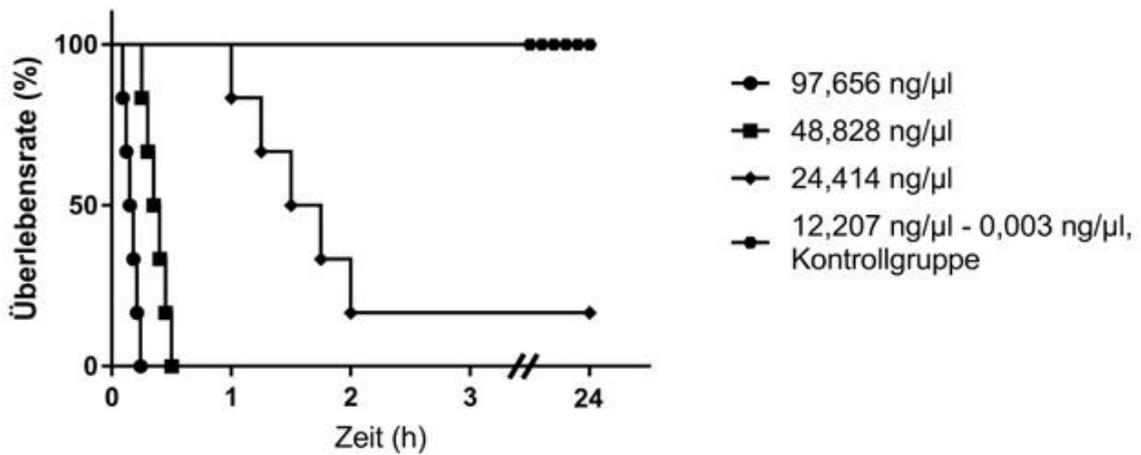


Abb. 8: Überlebenszeitanalyse erweiterte halbierende Verdünnungsreihe (in ng/µl) *Naja naja* (FE aus Chorionhülle geschlüpft, 72 hpf). Versuch 1 von 2, 6 FE pro Konzentration.

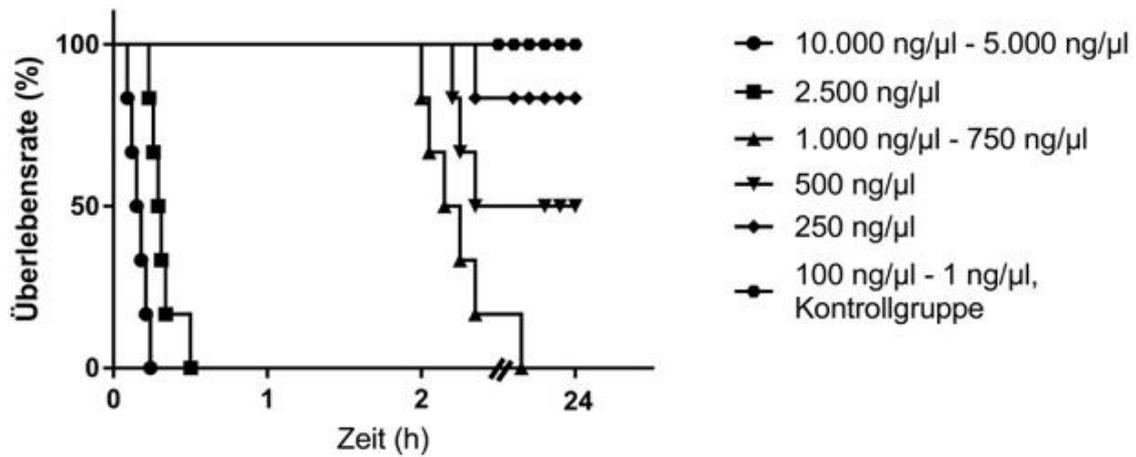


Abb. 9: Überlebenszeitanalyse logarithmische Verdünnungsreihe (in ng/µl) *Vipera ammodytes* (FE aus Chorionhülle geschlüpft, 72 hpf). Versuch 1 von 2, 6 FE pro Konzentration.

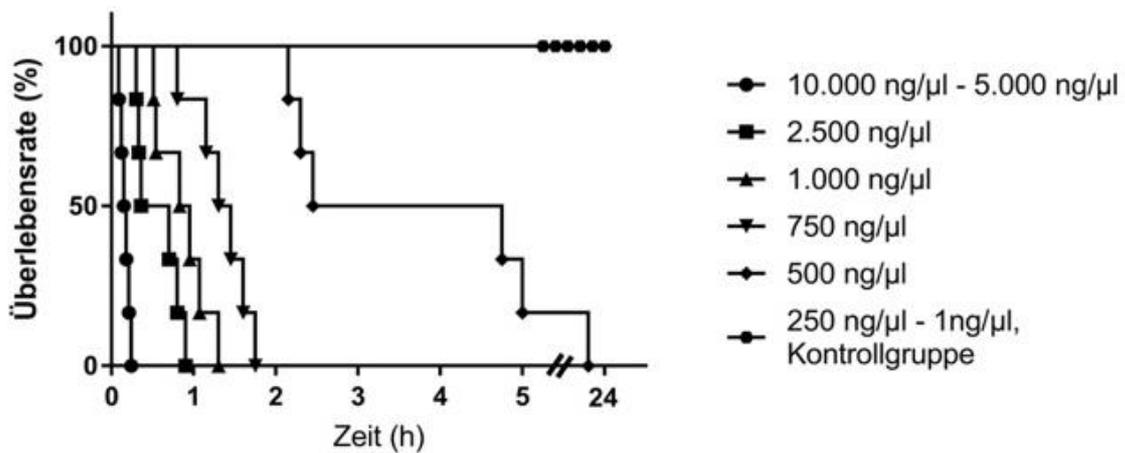


Abb. 10: Überlebenszeitanalyse logarithmische Verdünnungsreihe (in ng/µl) *Naja haje* (FE aus Chorionhülle geschlüpft, 72 hpf). Versuch 1 von 2, 6 FE pro Konzentration.

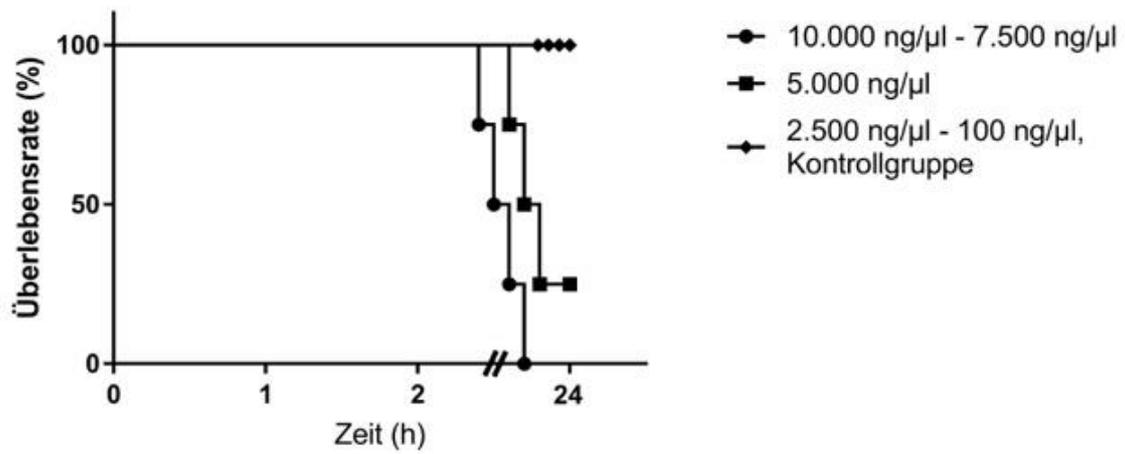


Abb. 11: Überlebenszeitanalyse logarithmische Verdünnungsreihe (in ng/µl) *Bitis arietans* (FE aus Chorionhülle geschlüpft, 72 hpf). Versuch 1 von 2, 4 FE pro Konzentration.

3.2 LC50-Berechnung

Die Ergebnisse der statistischen Berechnungen zu den fünf Veninen sind in Tabelle 10 dargestellt. Neben der LC50-Konzentration wurde der Einfluss der Gifte auf das Überleben der Fische per Regressionsanalyse überprüft und in Form des p-Wertes und der HR dargestellt. Außerdem wurden die Ergebnisse per Chi-Quadrat-Test auf ihre Vergleichbarkeit überprüft.

Tabelle 10: Statistische Berechnungen der Venine der *Crotalus atrox*, *Naja naja*, *Vipera ammodytes*, *Naja haje* und *Bitis arietans*

		LC50 (95%-KI) in ng/ul	Hazard Ratio (95%-KI)	p-Wert	Chi-Quadrat-Test (p-Wert)
<i>Crotalus atrox</i>	Exp. 1	3.379,4 (2.183,7 – 5.031,2)	4,265 (2,964 – 5,566)	< 0,0001	0,466
	Exp. 2	4.047,4 (2.947,4 – 5.569,4)			
	Exp. 3	4.418,5 (3.214,7 – 6.086,4)			
	Mittlere LC50	3.948,4			
<i>Naja naja</i>	Exp. 1	19,1 (12,4 – 29,3)	4,373 (2,357 – 6,390)	< 0,0001	0,999
	Exp. 2	33,1 (9,9 – 102,6)			
	Exp. 3	33,1 (9,9 – 102,6)			
	Mittlere LC50	28,4			
<i>Vipera ammodytes</i>	Exp. 1	386,7 (234,8 – 590,8)	3,155 (1,823 – 4,486)	< 0,0001	0,997
	Exp. 2	468,4 (297,8 – 704,6)			
	Mittlere LC50	427,6			
<i>Naja haje</i>	Exp. 1	316,2 (156,2 – 495,3)	3,285 (1,290 – 5,280)	0,0001	0,899
	Exp. 2	259,0 (7,6 – 1.725,1)			
	Mittlere LC50	287,6			
<i>Bitis arietans</i>	Exp. 1	4.238,3 (2.062,5 – 8.951,2)	2,727 (1,442 – 4,011)	< 0,0001	0,966
	Exp. 2	7.188,6 (4.512,6 – 13.081)			
	Exp. 3	2.930,1 (1.375,5 – 5.455,0)			
	Mittlere LC50	4.785,7			
LC50: mittlere letale Konzentration, KI: Konfidenzintervall, p-Wert: Signifikanzlevel, Exp.: Experiment					

Für die LC50-Konzentrationen ergaben sich, bei den Versuchen mit dem Gift der *Crotalus atrox*, die Konzentrationen 3.379,4 ng/µl, 4.047 ng/µl und 4.418,5 ng/µl. Für das Gift der *Naja naja* ergaben sich LC50-Konzentrationen von 19,1 ng/µl und 33,1 ng/µl, für das Gift der *Vipera ammodytes* wurden die LC50-Konzentrationen 386,7 ng/µl und 468,5 ng/µl berechnet. Das Gift der *Naja haje* zeigte LC50-Konzentrationen von 316,2 ng/µl und 259,0 ng/µl. Bei den Versuchen mit dem Gift der *Bitis arietans* ergaben sich LC50-Konzentrationen von 4.238 ng/µl und 7.188,6 ng/µl berechnet, nach Zugabe von Tween20 wurde die LC50-Konzentration auf 2.930,1 ng/µl gesenkt.

Bei dem Test auf Güte der Anpassung wies ein p-Wert mit einer hohen Signifikanz, wie in den vorliegenden fünf Versuchen (s. Tabelle 10, p-Werte = 0,001 und < 0,001), auf eine gute Anpassung hin. Die HR-Werte (s. Tabelle 10) der fünf Versuche zeigten, dass eine Zunahme der Giftkonzentration die Letalitätsrate der Fischembryonen erhöht. Im Chi-Quadrat-Test wurde durch ein nicht signifikantes Ergebnis aller Versuche (s. Tabelle 10, p-Werte > 0,05) gezeigt, dass die Regressionsgeraden parallel sind und die Experimente untereinander reproduzierbar und vergleichbar sind. Zur Validierung der Ergebnisse wurden jeweils zwei LC50-Konzentrationen eines Giftes in Verhältnis zueinander gesetzt und überprüft, ob diese Quotienten jeweils im 95%-Konfidenzintervall der Verhältnisse der anderen LC50-Ergebnisse lagen. Bei den Giften *Crotalus atrox*, *Naja naja*, *Vipera ammodytes*, *Naja haje* und *Bitis arietans* (ohne Tween20 Zugabe) konnte somit eine Vergleichbarkeit der Versuchsreihen gezeigt werden.

3.3 Neutralisationsanalysen nach Exposition mit Gift der *Naja haje* und PSASA

3.3.1 Toxizität des Antivenins

Direkt nach Zugabe des lyophilisierten Antivenins konnte für die Konzentration 243,5 µg/µl eine Letalitätsrate von 100% beobachtet werden. Bei der Kontrolle 30 Minuten nach Zugabe war die Konzentration 24,35 µg/µl für alle beobachteten Fischembryonen tödlich. Nach 24 Stunden konnte bei der Konzentration 2,435 µg/µl eine Letalitätsrate von 100%, bei der Konzentration 0,2435 µg/µl von 75% und bei 0,02435 µg/µl von 50% beobachtet werden. Die Kontrollgruppe zeigte zu keinem Zeitpunkt Anzeichen einer Einschränkung der Vitalfunktionen auf. Das unbehandelte Antivenin war in der Konzentration 26,78 µg/µl direkt nach Zugabe zu 100% letal. Die weiteren Konzentrationen waren nach 24 Stunden nicht toxisch (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Letalitätsraten (in %) des lyophilisierten und des unbehandelten Antivenins (in µg/µl)

t nach AV-Zugabe		direkt	30 min	2 h	24 h
AV-Konzentrationen					
Lyophilisiertes Antivenin	243,5 µg/µl	100%	100%	100%	100%
	24,35 µg/µl	0%	100%	100%	100%
	2,435 µg/µl	0%	0%	0%	100%
	0,2435 µg/µl	0%	0%	0%	75%
	0,02435 µg/µl	0%	0%	0%	50%
	Kontrolle (E2-Medium)	0%	0%	0%	0%
Unbehandeltes Antivenin	26,78 µg/µl	100%	100%	100%	100%
	2,678 µg/µl	0%	0%	0%	0%
	0,2678 µg/µl	0%	0%	0%	0%
	0,02678 µg/µl	0%	0%	0%	0%
	0,002678 µg/µl	0%	0%	0%	0%
	Kontrolle (E2-Medium)	0%	0%	0%	0%

t: Zeit, AV: Antivenin, min: Minuten, h: Stunden

3.3.2 EC50-Ergebnisse mit lyophilisiertem Antivenin

Für die Fischembryonen, die mit einem Gemisch aus lyophilisiertem Antivenin und der dreifachen LC50-Konzentration des Giftes der *Naja haje* versetzt wurden, wurde unmittelbar nach Zugabe des Antivenin-Venin-Gemischs für die Konzentration 1 eine Letalitätsrate von 100% beobachtet. In den Kontrollen bis zwei Stunden nach Giftzugabe konnte für die restlichen Konzentrationen keine Veränderung der Letalität festgestellt werden. Bei der Kontrolle nach 24 Stunden waren alle Konzentrationen für die Fischembryonen zu 100% letal. Die Kontrollgruppe zeigte eine Letalitätsrate von 0% (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Letalitätsraten (in %) der dreifachen LC50-Konzentration des Venins der *Naja haje* und logarithmischer Verdünnungsreihe aus lyophilisiertem Antivenin (in µg/µl)

t nach Giftzugabe \ Konzentrationen	direkt	30 min	2 h	24 h
Konzentration 1: 1.000 ng/µl Venin + 243,5 µg/µl AV	100%	100%	100%	100%
Konzentration 2: 1.000 ng/µl Venin + 24,35 µg/µl AV	0%	0%	0%	100%
Konzentration 3: 1.000 ng/µl Venin + 2,435 µg/µl AV	0%	0%	0%	100%
Konzentration 4: 1.000 ng/µl Venin + 0,2435 µg/µl AV	0%	0%	0%	100%
Konzentration 5: 1.000 ng/µl Venin + 0,02435 µg/µl AV	0%	0%	0%	100%
Kontrolle (E2-Medium)	0%	0%	0%	0%

t: Zeit, AV: Antivenin, min: Minuten, h: Stunden

Die Neutralisation der dreifachen Venindosis LC50 bei 50% der exponierten Fischembryonen nach WHO-Standard konnte bei keiner der untersuchten Antiveninkonzentrationen beobachtet werden.

3.3.3 EC50-Ergebnisse mit unbehandeltem Antivenin

Der Erstversuch des unbehandelten Antivenins, direkt aus der Ampulle, und der dreifachen LC50-Konzentration des Giftes der *Naja haje* zeigte ähnliche Letalitätsraten wie die unter 3.3.2. dargestellten Ergebnisse. Die Konzentration 1 zeigte nach zwei Stunden eine Letalitätsrate von 100%, die Konzentrationen 2 bis 5 hatten nach 24 Stunden eine Letalitätsrate von 100% (s. Tabelle 13). Ein Neutralisationseffekt des Antivenins nach WHO-Vorgabe, bei dem 50% der exponierten Population für 24 Stunden überlebt, wurde nicht beobachtet.

Tabelle 13: Letalitätsraten (in %) der dreifachen LC50-Konzentration des Giftes der *Naja haje* und logarithmischer Verdünnungsreihe aus unbehandeltem Antivenin (in µg/µl)

t nach Giftzugabe \ Konzentrationen	direkt	30 min	2 h	24 h
Konzentration 1: 1.000 ng/µl Venin + 26,78 µg/µl AV	0%	0%	100%	100%
Konzentration 2: 1.000 ng/µl Venin + 2,678 µg/µl AV	0%	0%	0%	100%
Konzentration 3: 1.000 ng/µl Venin + 0,2678 µg/µl AV	0%	0%	0%	100%
Konzentration 4: 1.000 ng/µl Venin + 0,02678 µg/µl AV	0%	0%	0%	100%
Konzentration 5: 1.000 ng/µl Venin + 0,002678 µg/µl AV	0%	0%	0%	100%
Kontrolle (E2-Medium)	0%	0%	0%	0%

t: Zeit, AV: Antivenin, min: Minuten, h: Stunden

Im modifizierten Folgeversuch mit Gemischen von logarithmischen Verdünnungsreihen aus Venin und Antivenin wurden Letalitätsraten erfasst und in Tabelle 14 dargestellt. Die beiden höchsten Veninkonzentrationen, 13.300 ng/µl und 1.330 ng/µl, waren im Gemisch mit den beiden höchsten Antiveninkonzentrationen 26,78 µg/µl und 2,678 µg/µl direkt für 100% der Fischembryonen tödlich. Die Gemische aus den Antiveninkonzentrationen 0,2678 µg/µl bis 0,002678 µg/µl mit der Veninkonzentration 1.330 ng/µl waren nach drei Stunden letal, während die Kombination mit der Veninkonzentration 13.300 ng/µl bereits nach 30 Minuten zu 100% tödlich war. Veninkonzentrationen zwischen 133 ng/µl und 1,33 ng/µl waren nach 24 Stunden nicht letal. Ein Gemisch mit den beiden

höchsten Antiveninkonzentrationen war nach 24 Stunden für 100% der Fischembryonen letal (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: Letalitätsraten (in %) der fünf Giftkonzentrationen 13.300 ng/µl bis 1,33 ng/µl nach Zugabe der fünf Antiveninkonzentrationen 26,78 µg/µl bis 0,002678 µg/µl

Zeitpunkt nach Giftzugabe Giftkonz. (in ng/µl) Antiveninkonz. (in µg/µl)		direkt	30 min	3 h	20 h	24 h
		13.300	100%	100%	100%	100%
26,78	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2,678	0%	100%	100%	100%	100%	100%
0,2678	0%	100%	100%	100%	100%	100%
0,02678	0%	100%	100%	100%	100%	100%
0,002678	0%	100%	100%	100%	100%	100%
1.330	100%	100%	100%	100%	100%	100%
26,78	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2,678	0%	0%	100%	100%	100%	100%
0,2678	0%	0%	100%	100%	100%	100%
0,02678	0%	0%	100%	100%	100%	100%
0,002678	0%	0%	100%	100%	100%	100%
133	100%	100%	100%	100%	100%	100%
26,78	0%	0%	0%	100%	100%	100%
2,678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,2678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,02678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,002678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
13,3	100%	100%	100%	100%	100%	100%
26,78	0%	0%	0%	0%	100%	100%
2,678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,2678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,02678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,002678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1,33	100%	100%	100%	100%	100%	100%
26,78	0%	0%	0%	0%	0%	100%
2,678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,2678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,02678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,002678	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Kontrollgruppen	Venin (ng/µl)					
	13.300	100%	100%	100%	100%	100%
	1.330	0%	100%	100%	100%	100%
	133	0%	0%	0%	0%	0%
	13,3	0%	0%	0%	0%	0%
	1,33	0%	0%	0%	0%	0%
	Antivenin (µg/µl)					
	26,78	100%	100%	100%	100%	100%
	2,678	0%	0%	0%	0%	0%
	0,2678	0%	0%	0%	0%	0%
0,02678	0%	0%	0%	0%	0%	
0,002678	0%	0%	0%	0%	0%	

min: Minuten, h: Stunden, Konz.: Konzentration

Für den, ca. vier Wochen später durchgeführten, Wiederholungsversuch wurden keine Modifikationen im Versuchsaufbau vorgenommen. Die Letalitätsrate nach

24 Stunden stimmt im Wiederholungsversuch mit den Ergebnissen des vorherigen Versuches überein.

3.3.3.1 Statistische Berechnungen

Aufgrund der Datenlage war eine Berechnung der EC50-Konzentration nicht möglich. Nach 24 Stunden konnte kein dauerhafter Neutralisationseffekt beobachtet werden. Tabelle 15 zeigt die LC50-Konzentration für die fünf Veninkonzentrationen, 13.300 ng/μl bis 1,33 ng/μl, ohne Antivenin Zugabe im Vergleich zu den LC50-Konzentrationen der fünf Veninkonzentrationen nach Zugabe jeweils einer Antiveninkonzentration, 26,78 μg/μl bis 0,002678 μg/μl.

Tabelle 15: Vergleich der LC50-Konzentrationen des Venins der *Naja haje* (in ng/μl) ohne Zugabe von Antivenin und nach Zugabe verschiedener Antiveninkonzentrationen

Venin-Konzentrationen	Antivenin-Konzentrationen	LC50 (95%-KI) in ng/μl
13.300 ng/μl 1.300 ng/μl 133 ng/μl 13,33 ng/μl 1,33 ng/μl	ohne AV-Zugabe	397,9 (33,4 – 4797,6)
	+ AV: 0,002678 μg/μl	397,9 (33,4 – 4797,6)
	+ AV: 0,2678 μg/μl	397,9 (33,4 – 4797,6)
	+ AV: 0,02678 μg/μl	397,9 (33,4 – 4797,6)
	+ AV: 2,678 μg/μl	0,192 (0,0 – 11,828)
	+ AV: 26,78 μg/μl	0,192 (0,0 – 11,828)

AV: Antivenin, KI: Konfidenzintervall

Ohne Zugabe von Antivenin wurde eine LC50-Konzentration von 397,9 ng/μl für die fünf Veninkonzentrationen berechnet. Durch Zugabe der drei Antiveninkonzentrationen 0,2678 μg/μl, 0,02678 μg/μl und 0,002678 μg/μl änderte sich diese LC50-Konzentration nicht und lag bei 397,9 ng/μl. Die Zugabe der beiden höchsten Antiveninkonzentrationen 26,78 μg/μl und 2,678 μg/μl führte zu einer Senkung der LC50-Konzentration auf 0,192 ng/μl. Die Zugabe von Antivenin in einer

Dosierung über 0,2678 µg/µl führte zu einer Steigerung der Toxizität gegenüber der alleinigen Betrachtung des Venins.

3.4 PH-Wert-Messung und Zusammensetzung des Antivenins

Gemessen wurden, wie unter 2.5.6. beschrieben, die pH-Werte des E2-Mediums, einer Verdünnung des Venins der *Naja haje* sowie des unbehandelten Antivenins. Das E2-Medium hatte einen pH-Wert von 7,22, die Verdünnung des *Naja haje* Gifts einen pH-Wert von 7,07 und das unbehandelte Antivenin von 6,92 (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: pH-Wert-Messungen E2-Medium, Gift der *Naja haje* und Antivenin

Substanz	pH-Wert
E2-Medium	7,22
Gift der <i>Naja haje</i>	7,07
Antivenin	6,92

Anschließend wurde die Zusammensetzung des polyvalenten Antivenins PSASA untersucht. Dieses besteht laut Beipackzettel neben den hoch konzentrierten Antikörperfragmenten, F(ab')₂-Fragmenten, u.a. aus einer isotonischen Natriumchloridlösung und M-Kresol.

3.5 Beobachtete Toxizität

Die Giftexposition von Fischembryonen zeigt konzentrationsabhängig unterschiedliche Wirkungen. Hohe Giftkonzentrationen verursachen i.d.R. sehr frühe Letalität, direkt nach Giftzugabe oder innerhalb von 30 Minuten. Sehr niedrige Konzentrationen haben i.d.R. keine Auswirkungen auf die Vitalfunktionen der Fischembryonen und besitzen keine toxische Wirkung zum von der OECD-Richtlinie vorgegebenen Beobachtungszeitpunkt nach 24 Stunden. Die Ergebnisse der Beobachtungen der Vitalfunktionen von Fischembryonen unter Giftexposition im subletalen Bereich sowie die Darstellung der unterschiedlichen Stadien des Erscheinungsbildes letaler Fischembryonen werden im Folgenden zusammengefasst dargestellt.

3.5.1 Vitalfunktionen im subletalen Bereich

In der folgenden Tabelle ist eine Zusammenfassung der Beobachtungen der Vitalfunktionen mit den Kriterien Herzschlag, Zirkulation, spontane Bewegung sowie unkontrollierte Zuckungen der einzelnen Konzentrationen, mit Angabe des subletalen Konzentrationsbereichs, dargestellt. Die Länge des Beobachtungszeitraums ist durch den Eintritt der Letalität begrenzt.

Tabelle 17 zeigt die Giftwirkungen im subletalen Bereich. Die Höhe der Giftkonzentrationen mit zeitlich begrenzter, subletaler Wirkung auf die Fischembryonen reicht, je nach Venin, von 10.000 ng/µl bei den Giften der *Naja haja* und *Bitis arietans* bis 24,414 ng/µl beim Gift der *Naja naja*. Auch die Dauer bis zum Eintritt der Letalität differiert vom Zeitpunkt direkt nach Giftzugabe bis 32 Stunden nach Giftzugabe. Alle fünf Gifte führten im subletalen Bereich zu einer Verlangsamung des Herzschlags. Eine Zirkulation war in diesem Bereich kaum sichtbar. Eingeschränkte spontane Bewegungen wurden bei den Giften *Crotalus atrox* und *Bitis arietans* beobachtet. Unkontrollierte Zuckungen der Fischembryonen waren bei den Giften der *Naja naja*, *Vipera ammodytes* und *Naja haja* sichtbar.

Tabelle 17: Darstellung des subletalen Konzentrationsbereichs und Auswirkungen der fünf Venine (*Crotalus atrox*, *Naja naja*, *Vipera ammodytes*, *Naja haja* und *Bitis arietans*) auf die Vitalfunktionen der Fischembryonen

Venin		<i>Crotalus atrox</i>	<i>Naja naja</i>	<i>Vipera ammodytes</i>	<i>Naja haja</i>	<i>Bitis arietans</i>
Subletaler Konzentrationsbereich (ng/µl)		7.500 – 5.000	100 – 24,414	10.000 – 250	10.000 – 500	10.000 – 5.000
Beobachtungsspanne (Zeit nach Giftzugabe)		direkt – 3 h	direkt – 30 min	direkt – 2 h	direkt – 5 h	30 min – 24 h
Vitalfunktion	Herzschlag	verlangsamt	verlangsamt	verlangsamt	verlangsamt	verlangsamt
	Zirkulation	kaum sichtbar	kaum sichtbar	kaum sichtbar	kaum sichtbar	kaum sichtbar
	Spontane Bewegung	eingeschränkt	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	eingeschränkt
	Zuckungen	nicht vorhanden	sichtbar	sichtbar	sichtbar	nicht vorhanden
min: Minuten, h: Stunden						

3.5.2 Erscheinungsbild letaler Fischembryonen

Im Folgenden wurde das Erscheinungsbild für die verwendeten Gifte zusammengefasst. Den Konzentrationen wurden drei Stadien des Erscheinungsbildes der Fischembryonen nach Ableben in der zeitlichen Betrachtung bis zu 24 Stunden zugeordnet (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Stadien des Erscheinungsbildes der letalen Fischembryonen nach Giftzugabe

Stadium I	Leichte Saumbildung und Krümmung des Körpers
Stadium II	Verstärkte Saumbildung und Krümmung
Stadium III	Starker Zersetzungsprozess mit wolkigem Erscheinungsbild und Verlust der Pigmentierung

Im ersten Stadium „leichte Saumbildung und Krümmung des Körpers“, das in der sehr schwach vitalen Phase des Fischembryos vor dem Endpunkt beginnen kann (s. Abb. 12), zeigen sich sehr schwache gewebezerstörende Prozesse an der Außenhaut und eine Veränderung des gestreckten Körpers in eine leichte Krümmung. Das zweite Stadium „verstärkte Saumbildung und Krümmung“ ist in Abbildung 13 dargestellt. Das dritte Stadium „starker Zersetzungsprozess“ kann von einer starken Krümmung des Körpers begleitet sein. Das Gewebe verliert seine Struktur bis hin zu einem wolkigen Erscheinungsbild, zudem ist ein Verlust der Pigmentierung wie in Abbildung 14 zu beobachten.



Abb. 12: Stadium I

Naja naja

Konzentration 24,414 ng/µl,
direkt nach Giftzugabe

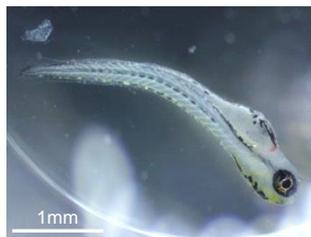


Abb. 13: Stadium II

Naja naja

Konzentration 24,414 ng/µl,
2 h nach Giftzugabe

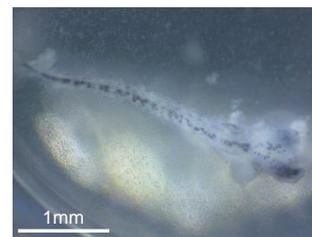


Abb. 14: Stadium III

Naja naja

Konzentration 24,414 ng/µl,
24 h nach Giftzugabe

Je nach Venintyp und Konzentration sind die Stadien I bis III nicht klar abgrenzbar, sondern überschneiden sich (s. Abb. 15 bis 20). Die Konzentrationen 7.500 ng/µl der Gifte *Bitis arietans* (mit Tween20) und *Vipera ammodytes* zeigen direkt nach Stadium I, sichtbare Krümmung und leichte Saumbildung (Abb. 15 und 18), das Stadium III mit einem starken Zersetzungsprozess, einer starken Krümmung und einer verminderten Pigmentierung (s. Abb. 16 und 19). Das wolkeartige Erscheinungsbild tritt bei beiden Giftkonzentrationen zum Beobachtungszeitpunkt nach 24 Stunden auf (s. Abb. 17 und 20).



Abb. 15: Stadium I
Bitis arietans mit Tween20
Konzentration 7.500 ng/µl,
1,5 h nach Giftzugabe



Abb. 16: Stadium III
Bitis arietans mit Tween20
Konzentration 7.500 ng/µl,
2 h nach Giftzugabe



Abb. 17: Stadium III (wolkeig)
Bitis arietans mit Tween20
Konzentration 7.500 ng/µl,
24 h nach Giftzugabe



Abb. 18: Stadium I
Vipera ammodytes
Konzentration 7.500 ng/µl,
direkt nach Giftzugabe



Abb. 19: Stadium III
Vipera ammodytes
Konzentration 7.500 ng/µl,
30 min nach Giftzugabe

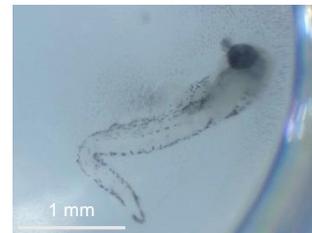


Abb. 20: Stadium III (wolkeig)
Vipera ammodytes
Konzentration 7.500 ng/µl,
24 h nach Giftzugabe

Bei sehr hoher Konzentration oder hohem Wirkungsgrad verläuft der Zersetzungsprozess mit großer Geschwindigkeit, sodass direkt nach Giftzugabe das zweite bzw. dritte Stadium erkennbar ist (s. Abb. 21).



Abb. 21: Stadium II-III
Naja haja
Konzentration 1.000 ng/ μ l,
direkt nach Giftzugabe

4 Diskussion

4.1 Validität der modifizierten OECD-Testkonditionen

Die Durchführung dieser experimentellen Studie erfolgte nach den Leitlinien zum akuten FET der OECD. Diese beinhalten Vorgaben zu allen Testbereichen, zur Auswahl der Zebrafisch-Linie *Danio rerio*, eine Befruchtungsrate der Eier von mindestens 70%, Überlebensraten von Negativkontrollen über 90%, Letalitätsraten von Positiv-Kontrollen über 30%, Vorgaben zur Qualität und Temperatur der Aufbewahrungsflüssigkeit der Fischembryonen, sowie Unbedenklichkeitstests für verwendete Lösungsmittel, um nur einige zu nennen. Die Testkonditionen entsprachen bis auf wenige Modifikationen diesem Anforderungskatalog. Auch die Darlegung der Forschungsergebnisse erfolgte in Anlehnung an die Richtlinien. Die vorgesehene 24-Well-Mikrotiterplatte wurde durch eine 96-Well-Mikrotiterplatte ersetzt, um die erforderliche Anzahl an Verdünnungsreihen eines Venins gleichzeitig aufbringen zu können (OECD, 2013). Der Zeitpunkt der Giftexposition erfolgte in Anlehnung an Chan et al. (2017) im ersten Versuch mit dem Gift der *Crotalus atrox* an Fischembryonen (48 hpf), die mit Pinzetten mechanisch dechorioniert wurden. Diese Vorgehensweise erwies sich als zeitaufwendig und war mit einem hohen Verletzungsrisiko für die Fischembryonen verbunden. Der Einsatz von Fischembryonen (48 hpf) mit Chorionhülle führte zu divergierenden Testergebnissen. Die Letalitätsrate lag bei Fischembryonen ohne Chorionhülle bei einer Konzentration von 6.250 ng/µl nach 90 Minuten bei 100%, bei Fischembryonen mit Chorionhülle erst nach 24 Stunden bei 100%. Möglicherweise besitzt die Chorionhülle eine protektive Funktion (Pelka et al., 2017, Sobanska et al., 2018). Für alle weiteren Versuche wurden Fischembryonen (72 hpf), die geschlüpft und intakt waren, verwendet und für einen Zeitraum von 24 Stunden, bis zu einem Alter von 96 hpf, beobachtet, um diesen möglichen protektiven Effekt, falls vorhanden, auszuschalten. Im Abschlussbericht zur Validierung des FETs für das OECD-Prüfrichtlinienprogramm sind Untersuchungen zur Barrierefunktion des Chorions des Centre for Organismal Studies der Universität Heidelberg eingeflossen, die diesen Ansatz untermauern. Die toxische Wirkung von LuquinatHM552 wurde an frisch geschlüpften Embryonen (72 hpf) und

dechorionierten Embryonen (48 hpf) getestet. Beide Ansätze führten zu den gleichen Ergebnissen und wurden als valide Vorgehensweise im FET in dem Bericht eingeordnet (Braunbeck, 2012). Ein weiterer Aspekt ist die zunehmende Permeabilität der Chorionhülle im Verlauf der embryonalen Entwicklung bis zum Zeitpunkt des Schlüpfens. Inwieweit Substanzen die Chorionhülle durchdringen können, hängt u.a. von ihrer molekularen Struktur ab. Gut wasserlösliche, nicht dissoziierte Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht gelangen über das Chorion in den Embryo, Substanzen mit einem Molekulargewicht von größer als 3000 Da durchdringen das Chorion beispielsweise nicht (Kais et al., 2013). Proteine aus Schlangengiften besitzen häufig ein sehr hohes Molekulargewicht. Für die Komponente Hyaluronidase wurde im Gift der *Bitis arietans* ein Molekulargewicht von 62,2 kDa ermittelt, um ein Beispiel zu nennen (Kunze, 2007).

Sobanska et al. arbeiteten in ihrer Studie 2018 zur Anwendbarkeit des FETs in der Europäischen Chemikalienverordnung zur Registrierung, Evaluierung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien (engl. REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) mit Fischembryonen bis zu einem Alter von 120 hpf. Sie betonen die Relevanz des späten Abschnittes des Beobachtungszeitraums mit der weiter fortgeschrittenen Entwicklung und somit größeren Ähnlichkeit zu den ausgewachsenen Tieren. Neben der bereits genannten, möglichen Barrierefunktion der Chorionhülle wird den Fischembryonen, je jünger sie sind, zudem eine verminderte Biotransformationskapazität gegenüber adulten Fischen zugeschrieben (Sobanska et al., 2018, Busquet et al., 2014, Mattingly and Toscano, 2001).

Die in dieser Studie gewählte Zeitspanne, von 72 hpf bis 96 hpf, ist somit zur angestrebten Bestimmung der LC50-Konzentration geeignet. Die OECD-Beobachtungskriterien wurden, auf die für den gewählten Beobachtungszeitraum relevanten Zwecke, angepasst. Fehlender Herzschlag und fehlende spontane Bewegung wurden als Letalitätskriterien verwendet. Die Beobachtung im subletalen Bereich wurde anhand der Kriterien verlangsamter Herzschlag, Sichtbarkeit der Zirkulation, Art der Bewegung und unkontrollierte Zuckungen durchgeführt.

Zur Beurteilung des Erscheinungsbilds letaler Fischembryonen wurden die Kriterien Saumbildung, Krümmung und verminderte Pigmentierung herangezogen. Auch unter den beschriebenen Modifikationen des FETs erfüllt diese Studie die Validitätskriterien der OECD-Richtlinie.

4.2 Unterschiede in der Höhe der LC50 bei Elapiden- und Viperngiften

Busquet et al. (2014), Chan et al. (2017) und Sobanska et al. (2018) haben ebenfalls das Versuchsmodell des Fischembryo-Assays eingesetzt und die LC50-Konzentration ermittelt. Ihre Forschungsergebnisse zeigen, dass eine Berechnung der mittleren letalen Konzentration anhand des FETs möglich ist. Auch die Ergebnisse dieser Dissertation mit unseren statistischen Berechnungen ergaben insgesamt eine gute Anpassung und Reproduzierbarkeit der durchgeführten FETs (s. Tabelle 10 unter 3.2.). Als zielführend zur Eingrenzung der LC50-Konzentrationsbereiche erwies sich der Einsatz von logarithmischen Verdünnungsreihen, gefolgt von halbierenden Verdünnungsreihen zur Feinabstimmung des Konzentrationsbereiches.

Die Abbildungen 8 bis 12 zeigen beispielhaft eine Überlebenszeitanalyse (s. Abb. 7 bis 11 unter 3.1.) pro Venin mit unterschiedlichen Konzentrationen. Mit Ausnahme von *Vipera ammodytes* trat die Letalität der gesamten Population bei höheren Konzentrationen in einem Zeitraum von bis zu fünf Stunden ein. Bei niedrigeren Konzentrationen überlebte die gesamte Population mindestens 24 Stunden. Der Konzentrationsbereich, in dem nur Teile der Population über 24 Stunden überleben, scheint sehr eng begrenzt zu sein. Dies könnte ein Hinweis auf einen möglichen Alles-oder-Nichts-Mechanismus sein, den Chan et al. (2017) bei ähnlichen Beobachtungen bei der Ermittlung der LC50-Konzentration von Crota-min-Rho-B als Erklärungsansatz anführen. Gregory et al. (2008) haben in ihrer Studie die Permeabilisierung von Phospholipid-Vesikeln mit dem antimikrobiellen Peptid Cecropin A untersucht und das Modell eines Alles-oder-Nichts-Mechanismus entwickelt. Cecropine sind antimikrobielle Peptide, die gezielt Bakterien unschädlich machen und in vielen Tierarten verbreitet sind. Als potenzielle

Alternative zum Einsatz von Antibiotika sind Cecropine seit zwanzig Jahren im Fokus der Forschung, darüber hinaus wird eine mögliche Anwendung im Bereich der Krebstherapie erforscht. Gregory et al. (2008) kommen zu dem Schluss, dass Cecropine die doppelschichtige Membran von Phospholipid-Vesikeln angreifen. Minimale Sequenzanforderungen ohne spezifische Rezeptoren scheinen für die Bindung des Peptids und für die Permeabilisierung der Vesikelmembran auszureichen. Sie konnten über Farbstoff-Freisetzung belegen, dass sich die Lipidvesikel nicht langsam, sondern abrupt entleeren. Bei einer niedrigen Peptidkonzentration auf der Membran bleiben die Vesikel dicht. In ihrem Modell gehen sie davon aus, dass ab einer bestimmten Konzentration die Bindung einer großen Anzahl von Peptidmolekülen erfolgt, die mechanische Spannungen in der Lipidmembran erzeugen. Wird der Druck zu groß, reißt die Membran und es kommt zur abrupten Leckage (Gregory et al., 2008).

Betrachtet man die Mittelwerte unserer berechneten LC50-Konzentrationen (s. Tabelle 10 unter 3.2.), betragen diese für *Naja naja* 28,4 ng/µl, für *Naja haje* 287,6 ng/µl, für *Vipera ammodytes* 427,6 ng/µl, für *Crotalus atrox* 3.948,4 ng/µl und für *Bitis arietans* 4.785,7 ng/µl. Es zeigen sich deutliche Unterschiede in der Letalität der beiden Elapiden- und der drei Viperngifte. Die Elapidengifte, insbesondere das Gift der *Naja haje*, töten Fischembryonen mit deutlich niedrigeren Konzentrationen und sind damit wesentlich effizienter als die von uns getesteten Viperidengifte. Allerdings liegt, beispielsweise unsere ermittelte LC50-Konzentration für *Crotalus atrox* mit 3.948,4 ng/µl im Vergleich zu der von Anderson et al. (2018) in ihrer Studie aus der Literatur angewendeten LD50-Konzentration von 200 µl/ml (\cong 200 ng/µl), um ein Vielfaches höher (Anderson et al., 2018). Für Qualitätsprobleme unserer beiden Giftchargen sowie Mängel bei der Lagerung oder in der Handhabung der Venine gab es keine Anhaltspunkte. Leichte Ergebnisabweichungen ergaben sich in unserer Studie lediglich bei zwei Versuchsreihen mit *Vipera ammodytes* und *Naja naja*. Die LC50-Konzentrationen in den Wiederholungsversuchen, die 10 bis 14 Tage nach Öffnung der Giftampullen durchgeführt wurden, lagen bei *Vipera ammodytes* (468,4 ng/µl zu 386,7 ng/µl) um den Faktor 1,2, bei *Naja naja* (33,1 ng/µl zu 19,1 ng/µl) um den Faktor 1,7 höher als

in den ersten Versuchsreihen. Ein Verlust der Giftigkeit des Venins trotz fachgerechter Lagerung kann vermutet werden. Auch andere Studien geben Hinweise auf FETs mit ungewöhnlich hohen LC50-Konzentrationen. Ali et al. ermittelten im Rahmen ihrer 2011 angefertigten Studie die LC50-Konzentrationen von 60 wasserlöslichen Chemikalien mit umfangreichen FETs in einer ähnlichen Vorgehensweise wie in unserer Studie. Fischembryonen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten bis zu 96 Stunden in verschiedenen Versuchsreihen unterschiedlichen Stoffkonzentrationen ausgesetzt. Die Bandbreite der berechneten LC50-Konzentrationen differierte noch wesentlich stärker als bei unseren Giften. Alkohole, z.B. Ethanol, hatten mit einer LC50-Konzentration von 36.212,0 ng/µl (in der Studie in mg/l angegeben) eine deutlich schwächere Toxizität bei Fischembryonen als alle anderen in dieser Studie getesteten Chemikalien. Eine Ausnahme in dieser Stoffgruppe bildete Tween80, das mit einer LC50-Konzentration von 323,4 ng/µl im Vergleich deutlich toxischer war. Die oberflächenaktiven Eigenschaften von Tween80 werden von den Verfassern als mögliche Erklärung herangezogen (Ali et al., 2011). Busquet et al. (2014) stellen dar, dass einzelne von ihnen getestete Verbindungen, als Beispiel ist Allylalkohol aufgeführt, nur bei extrem hohen Konzentrationen einen Effekt im FET zeigten, auch im Vergleich zum Toxizitätstest mit adulten Fischen. Als mögliche Erklärung werden zwei Aspekte aufgeführt. Zum einen erfordern einige Verbindungen eine metabolische Aktivierung, um ihre Giftwirkung zu entwickeln. Zum anderen können Unterschiede in der Biotransformationskapazität zwischen Fischembryonen und adulten Fischen zu unterschiedlich hohen LC50-Konzentrationen und somit zu divergierenden Einschätzungen der Toxizität führen. Studien zu FETs mit „ganzen“ Veninen, nicht nur mit einzelnen Veninkomponenten, sind rar. Für eine bessere Einschätzung unserer Ergebnisse ist die Durchführung von zusätzlichen FETs mit einer größeren Anzahl an Veninen erforderlich, um zu prüfen, ob die LC50-Konzentrationen dieser Studie bestätigt werden können und sich ein Unterschied in der Effizienz von Elapiden- und Viperngiften bei Fischembryonen weiter belegen lässt.

4.3 LC50 als Prognoseinstrument für Tierversuche

Eine interessante Fragestellung ist, inwieweit die in akuten FETs ermittelten LC50-Konzentrationen mit den in Tierversuchen erhobenen letalen Dosen 50% (LD50 in mg/kg), verglichen werden können. Ali et al. (2011) haben zu ihren, in FETs bestimmten, LC50-Konzentrationen LD50-Daten aus Versuchen mit Mäusen aus Literatur und Datenbanken gesammelt und Korrelationsanalysen erstellt. Für ihr Modell wurde die Annahme getroffen, die Einheiten der LC50 (mg/l) und der LD50 (mg/kg) gleichzusetzen. In ihrem statistischen Modell wurden für sechs Stoffklassen, chemische Verbindungen mit ähnlichen Eigenschaften, Korrelationen für die LC50/LD50-Paare berechnet. Die Ergebnisse zeigen Regressionsgeraden mit unterschiedlichen Steigungen (Zebrafischembryonen \log LC50 / Mäuse \log LD50) für die sechs Stoffklassen: Carboxylsäuren (0,36), Alkaloide (0,56), Glykoside (0,77), Amide (1,06), Alkohole (1,24) und andere (1,27). Während Amide sich für Mäuse und Fischembryonen als gleich toxisch darstellen, sind Alkohole, wie bereits erwähnt, für Fischembryonen deutlich weniger toxisch. Dagegen erweisen sich Carboxylsäuren für Fischembryonen als signifikant toxischer. Als mögliche Einflussfaktoren werden Unterschiede in der chemischen Verbindung, der Absorption, des Stoffwechsels und in der Art des Wirkmechanismus der Substanz aufgeführt. Der FET besitzt aus Sicht der Autoren deutliches Potenzial zur Beurteilung der Toxizität von chemischen Substanzen. Die Toxizität kann jedoch im Vergleich zu den bekannten LD50-Werten aus Tierversuchen, je nach Stoffklasse, variieren und sollte weiter erforscht werden.

Ducharme et al. (2015) haben in ihrer Metastudie Toxizitätsdaten von 600 chemischen Verbindungen aus FET-Studien mit Toxizitätsdaten von Tierversuchen aus der Literatur zusammengeführt. Neben akuten Toxizitätsdaten, LC50-Konzentrationen bei Fischembryonen sowie LD50-Daten aus Tierversuchen, standen Daten zur Teratogenität im Fokus. Ziel der Studie war, die Übertragbarkeit der Ergebnisse von FETs auf Ergebnisse aus In-vivo-Tests mit Ratten, Mäusen, sowie Kaninchen, zu überprüfen. Aufgrund der häufig unvollständigen Datenlage konnte für zahlreiche Substanzen keine Korrelation ermittelt werden. Der FET könnte aus Sicht der Forscher für ein Anfangsscreening zur Prognose der

Toxizität bei Tierversuchen aufgrund der Korrelation der LD50-Werte bei den Expositionsformen Inhalation sowie subkutane Injektion bei Ratten und Mäusen mit den LC50-Werten der Fischembryonen eingesetzt werden. Ein Nachteil ist die zurzeit noch mangelnde Verfügbarkeit von vergleichbaren Daten. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass es sich bei einer LC50-Konzentration um die Konzentration des Expositionsmediums, nicht um die Konzentration im Fischembryo handelt. Geschlüpfte Fischembryonen sind dem Gift über drei Wege, Haut, Kiemen und Maul, ausgesetzt, was eine Einschätzung der Giftwirkung erschwert (Ducharme et al., 2015).

Stellt man die in unserer Studie ermittelten LC50-Konzentrationen der in den Sicherheitspapieren der Firma Latoxan aufgeführten LD50-Dosen (Latoxan, 2012a, Latoxan, 2012b, Latoxan, 2012e, Latoxan, 2012c, Latoxan, 2012d), Exposition durch intravenöse Injektion, in einer Tabelle gegenüber (s. Tabelle 19), zeigen sich für alle FET-Werte extrem hohe Konzentrationen im Vergleich zur Maus. Die Gifte der Elapiden und der *Vipera ammodytes* wirkten auch bei Mäusen schon in niedrigeren Konzentrationen als bei den Viperidengiften *Crotalus atrox* und *Bitis arietans*. Diese Tendenz wurde in unseren Versuchsreihen bestätigt.

Tabelle 19: Vergleich der LD50-Werte (in mg/kg, intravenöse Verabreichung im Tierversuch) und LC50-Konzentrationen (in mg/l, FET)

	LD50 (mg/kg)	LC50 (mg/l)
<i>Crotalus atrox</i>	2,72	3.948,4
<i>Naja naja</i>	0,22	28,4
<i>Vipera ammodytes</i>	0,45	427,6
<i>Naja haje</i>	0,95	287,6
<i>Bitis arietans</i>	7,75	4.785,7

Die Höhe der LC50-Werte in unseren FETs ist erstaunlich, denn Schlangengifte sind hochtoxische Substanzen, die ihr Ziel, die Beute in kürzester Zeit bewegungsunfähig zu machen und zu töten, wirkungsvoll erreichen. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte eine Wirkungsabschwächung der Venine aufgrund der Verdünnung im wässrigen Milieu sein. Zudem erreicht das Gift den Embryo primär über die Haut, bestehend aus Muskelschicht, dermalen Stroma und

zweilagiger Epidermis, mit basaler Zellschicht und einem superfiziellen Epithel, die als Barriere zu betrachten ist (Rakers, 2012). Eine ähnliche Beobachtung wurde, wie bereits dargestellt, bei der Chorionhülle gemacht. In der Natur wird durch den Biss, sowie im Tierversuch mit intravenöser oder subkutaner Injektion, die Hautbarriere mechanisch überwunden, wodurch das Venin schnell in den Blutkreislauf gelangt und dort unmittelbar seine Wirkung entfalten kann (Turner et al., 2011, Shimizu, 2004).

Die Hinweise aus den o.g. Studien zur Toxizitätsbestimmung von Chemikalien können hilfreiche Erklärungsansätze für die hohen LC50-Konzentrationen unseres FETs mit Veninen liefern. Die Sensibilität von Fischembryonen war bei einigen chemischen Substanzen ebenfalls deutlich niedriger als bei Nagern. Venine sind eine hochkomplexe Mischung aus Proteinen und Peptiden mit den unterschiedlichsten Eigenschaften, die auf Erfolg bei der Jagd auf Beute z.B. Nager, programmiert sind. Der Organismus der Fischembryonen gehört nicht in dieses Beuteschema. Unterschiede in der Biotransformationskapazität könnten eine Rolle spielen. Auch die Art der Exposition, sowie ein Verdünnungseffekt durch das wässrige Milieu scheinen höhere Gifkonzentrationen im FET als bei Tierversuchen zu begünstigen. Diese Aspekte könnten zusätzlich den bereits in den Überlebenszeitanalysen vermuteten Alles-oder-Nichts-Effekt im FET bei Veninen untermauern. Übereinstimmend ist aber die Tendenz zu einer höheren Effizienz von Elapidengiften und dem Gift der *Vipera ammodytes* im Vergleich zu den restlichen Viperidengiften in beiden Versuchsarten. Eine Vergleichbarkeit der mittleren letalen Konzentration bzw. Dosis zwischen FET und Tierversuchen konnte auf Basis unserer Studie nicht hergestellt werden. Weitere Versuchsreihen müssen für eine Einschätzung des FETs, als Prognoseinstrument für die Toxizität von Schlangengiften bei In-vivo-Testverfahren, durchgeführt werden.

4.4 FET als möglicher Indikator für Neurotoxizität

Die Veninforschung greift seit einiger Zeit auf moderne Methoden der Protein-, Transkript- und Genomforschung zurück, um die Zusammensetzung und die Wirkung einzelner Veninkomponenten zu entschlüsseln (Ojeda et al., 2018).

In ihrem Review zu Studien zur Zusammensetzung von Veninen stellten Tsasoulis und Isbister die Komponenten von 132 Schlangengiften zusammen. Die Gifte der Familie der *Elapidae* machten 12%, die der *Viperidae* 47% des Reviews aus. Von den 63 gelisteten Proteinfamilien spielten die drei Enzymgruppen Phospholipase A2 (PLA2), Metalloprotease (MP) und Serinprotease (SP), sowie nicht enzymatische Dreifinger-Toxine (3FTx) eine dominante Rolle (Tsasoulis and Isbister, 2017).

Als Enzym hydrolysiert PLA2 Phospholipide. Die freigesetzten Hydrolyseprodukte aktivieren, über Signaltransduktionsvorgänge an Zellmembranen, zelluläre Pathologien an Leukozyten, Blutplättchen und Endothel. Inflammation und Störungen der Blutgerinnung sind die Folge. Aktuelle Erkenntnisse der biomolekularen Forschung gehen von hochkomplexen Wirkmechanismen mit PLA2-Beteiligung aus, die tief in die endogenen Signalsysteme der Beute bzw. des Opfers eingreifen und einen amplifizierenden Effekt der Giftdosis hervorrufen (Bickler, 2020). MP wirkt proteolytisch, führt zur Degradation von Proteinstrukturen z.B. der Basallamina von vaskulären Zellen und besitzt pro- sowie antikoagulatorische Wirkung. Inflammation und Gewebenekrose sind typische Symptome (Gasanov et al., 2014). SP ist Thrombin-ähnlich und verursacht antikoagulatorische sowie fibrinolytische Aktivitäten. Eine Störung der Hämostase und Hypotension sind die Folge. Die meisten 3FTxe wirken neurotoxisch, können aber auch kardiotoxische Eigenschaften besitzen. Ein bekanntes Beispiel ist α -Bungarotoxin, ein 3FTx, das die postsynaptische Membran der neuromuskulären Endplatte blockiert (Chang, 1962). β -Bungarotoxin ist dagegen eine nicht enzymatisch wirkende PLA2-Komponente, die wie ein 3FTx neurotoxisch wirkt und die Neurotransmission an der präsynaptischen Endplatte blockiert (Strong et al., 1976).

In unserer Studie betrachten wir die Toxizität von fünf Veninen. Die beiden Elapidengifte besitzen einen sehr hohen Anteil an 3FTx, *Naja haje* (60%) und *Naja naja* (je nach Herkunft zwischen 63,8% und 80,5%), sowie einen Anteil an PLA2, *Naja haje* (4%) und *Naja naja* (11,4% bis 14%). Beide Gifte sind in ihrer Wirkung als stark neurotoxisch klassifiziert (Tasoulis and Isbister, 2017). Das Safety Data Sheet, der von Latoxan für diese Studie bereitgestellten Naja-Gifte, beschreibt die Symptomatik beider Venine beim Menschen als neuromuskuläres Syndrom mit sensomotorischen Störungen, Scheinkoma und Atemnot mit möglicher Todesfolge durch Atemstillstand (Latoxan, 2012c, Latoxan, 2012d). Auffallend in dieser Studie war bei den Beobachtungen der Vitalfunktionen der Fischembryonen unter Exposition der Naja-Gifte im subletalen Konzentrationsbereich, das Auftreten von unkontrollierten Zuckungen, die als Zeichen ihrer neurotoxischen Wirkung bewertet werden können (s. Tabelle 17 unter 3.5.1.). Dies ist aus unserer Sicht ein Indiz, dass mit dem FET ein Venin auf Neurotoxizität getestet werden könnte. Zu einem ähnlichen Schluss gelangen Chan et al. (2017) bei ihren umfangreichen Untersuchungen der Wirkungen des 3FTxs RhoB-Crotamin. Unter chronischer Giftexposition wurde als Ursache, für die nach sehr kurzer Zeit stark beeinträchtigte Schwimmleistung der Zebrafischembryonen, eine Schädigung von Nerven- und Muskelzellen durch selektive Blockade der spannungsabhängigen Kalium-Kanäle vermutet.

Typisch für Viperngifte sind hohe Anteile an MP und SP. Das Gift der *Crotalus atrox* enthält unter den Viperngiften in unserer Studie den höchsten Anteil an SP (49,7%), sowie MP (19,8%). Das Gift der *Bitis arietans* enthält MP (38,5%) und SP (19,8%). Beide Enzyme besitzen eine hohe Gewebetoxizität und stören die Hämostase (Tasoulis and Isbister, 2017). In den Latoxan Safety Data Sheets für *Crotalus atrox* (Latoxan, 2012a) und *Bitis arietans* (Latoxan, 2012b) wird die Symptomatik beim Menschen als hämatologisches Syndrom mit stechenden Schmerzen, hämorrhagischen Symptomen, progredienter Nekrose und hypovolämischem Schock beschrieben. Die gewebetoxische Wirkung ist in unserer Studie im subletalen Bereich anhand der Saumbildung und Krümmung der Fischembryonen ansatzweise sichtbar, konnte erst aber im letalen Stadium I-III der

Fischembryonen anhand des schnell voranschreitenden Zersetzungsprozesses, in den Abbildungen 12 bis 21 (s. unter 3.5.2.) beispielhaft dargestellt, beobachtet werden. Sie tritt bei den Elapiden allerdings ähnlich auf. Der im letalen Stadium beobachtete Zersetzungsprozess sollte eher als Ausprägung des Vorverdauungsprozesses, den alle Schlangengifte neben Immobilisation und Tötung der Beute als Funktion im Rahmen der Evolution entwickelt haben, gewertet werden. Die Bewegungsfähigkeit der Fischembryonen ist bei *Crotalus atrox* und *Bitis arietans* zwar eingeschränkt, aber es treten keine unkontrollierten Zuckungen, als Indikator für einen neurotoxischen Wirkmechanismus, auf. Dies entspricht dem Fehlen von neurotoxischen Komponenten in der Giftzusammensetzung. Ein Sonderfall ist das Gift der *Vipera ammodytes* mit einer für Vipern untypischen, neurotoxischen Wirkung, die durch die Beobachtung von unkontrollierten Zuckungen in unserer Studie untermauert wird. Die Betrachtung der Giftzusammensetzung zeigt, neben der für Vipern typischen MP (25%) und SP (30%), einen ungewöhnlich hohen Anteil an PLA2 (26%) (Tasoulis and Isbister, 2017). Auch die Sicherheitsinformationen zu *Vipera ammodytes* von Latoxan (Latoxan, 2012e) beschreiben neben den für Vipern typischen Giftwirkungen - leicht hämorrhagisch und hoch inflammatorisch - in einigen Fällen eine neurotoxische Symptomatik. Einige Studien haben nachgewiesen, dass das Gift der *Vipera ammodytes* Vipotoxine und Ammodytoxine enthält. Bei beiden handelt es sich um nicht enzymatisch wirkende PLA2, die die neuromuskuläre Transmission blockieren. Zusätzliche azidotische Komponenten besitzen in beiden Toxintypen eine Toxin-amplifizierende Wirkung (Šribar et al., 2019). Atanasov et al. (2012) beschreiben, im Tierversuch an Mäusen, die klinischen Symptome von Vipotoxin als klassisch neurotoxisch mit Agitation, Ataxie, Konvulsion, Parese und Tod (Atanasov et al., 2012).

Die Veninforschung hat auf molekularer Ebene in den letzten zehn Jahren große Erfolge in der Erforschung der Zusammensetzung von Veninen und ihrer Wirkweise erzielt. Die Komplexität der toxischen und enzymatischen Prozesse, die tief in neurologische und physiologische Systeme eingreifen, ist hoch und in vielen Teilen noch nicht verstanden. Neurotoxine gehören zu den effizientesten Giftkomponenten. In den Beobachtungen unserer Studie erwies sich das Gift der

Vipera ammodytes als neurotoxisch. Im Bereich der Gewebetoxizität waren unsere Beobachtungen für alle getesteten Venine ähnlich und damit weitgehend unspezifisch. Aus unserer Sicht scheint eine weitere Überprüfung des FETs, als möglicher Indikator für den Nachweis von Neurotoxizität bei Veninen ein Aspekt, der weiterverfolgt werden könnte.

4.5 Neutralisationseffekt durch das Antivenin

Das Ziel der EC50-Versuche bei dreifacher LC50-Konzentration einen Neutralisationseffekt durch das Antivenin PSASA, wie im WHO-Tierversuch, zu erreichen, trat zu keinem Zeitpunkt ein. Im modifizierten EC50-Versuch mit logarithmischen Verdünnungsreihen für Antivenin und Venin (s. Tabelle 14 unter 3.3.3.) zeigte sich für einen kurzen Zeitraum ein Neutralisationseffekt der Veninkonzentrationen 13.300 ng/µl bzw. 1.330 ng/µl in Kombination mit den Antiveninkonzentrationen 0,2678 µg/µl bis 0,002678 µg/µl. Zum Beobachtungszeitpunkt nach 30 Minuten bzw. drei Stunden konnte eine gesteigerte Überlebensrate im Vergleich zu den Veninkonzentrationen ohne Zugabe von Antivenin beobachtet werden. Dies könnte als temporärer Neutralisationseffekt des Antivenins interpretiert werden. Unter dieser Prämisse wäre die Ermittlung einer EC50-Konzentration mithilfe des Fischembryo-Assays prinzipiell möglich. In einer Dosierung über 0,2678 µg/µl führte das PSASA in Kombination mit dem Gift der *Naja haje* allerdings zu einer erheblichen Herabsetzung der LC50-Konzentration von 397,7 ng/µl auf 0,192 ng/µl und damit zu einer deutlichen Steigerung der Toxizität. Ein additiver toxischer Effekt des Antivenins PSASA lässt sich beschreiben.

Zebrafischembryonen kommen in der freien Natur in verschiedenen Habitaten vor und zeigen eine große Toleranz gegenüber wechselnden Umweltbedingungen (Spence et al., 2008), so auch gegenüber schwankenden pH-Werten zwischen 5,9 bis 9,8 (Engeszer et al., 2007). Für einen optimalen Lebensraum der Fischembryonen sollte in der Laborhaltung ein stabiler pH-Wert zwischen 6,8 und 7,5 vorliegen (Brand et al., 2002, Avdesh et al., 2012, Westerfield, 2000). Der pH-Wert des vom Max-Planck-Institut Tübingen zur Verfügung gestellten und in dieser Studie verwendeten E2-Mediums von 7,22 lag in dem von Brand et al.

(2002), Avdesh et al. (2012) und Westerfield et al. (2000) empfohlenen Bereich. Die Überprüfung des pH-Wertes des Antivenins zeigte einen im Vergleich zum E2-Medium niedrigeren und leicht azidotischeren pH-Wert von 6,92 an, der immer noch in dem empfohlenen Bereich zwischen 6,8 und 7,5 lag. Der veränderte pH-Wert als Ursache für den additiven toxischen Effekt konnte ausgeschlossen werden.

Die anschließende Untersuchung der Zusammensetzung des Antivenins ergab, dass ein Milliliter PSASA 3,5 mg M-Kresol enthält. M-Kresol, ein Phenol-Derivat, wird in der Herstellung von Antiveninen als Beistoff zur Konservierung (Abd-Elsalam et al., 2011, Meyer et al., 2007, Segura et al., 2009) und als antimikrobieller Schutz verwendet (Abd-Elsalam et al., 2011). Studien von Meyer et al. (2007) und von Cheng und Kligerman zeigen einen toxischen Effekt von M-Kresol beim Menschen mit schweren Folgen für Leber und Niere (Cheng and Kligerman, 1984), im Extremfall ein Multiorganversagen (Gupta et al., 2008). In der Arbeit von Hasanin und Fouad wurde M-Kresol als moderat fischtoxisch (Hasanin and Fouad, 2009) eingeschätzt. Die additive toxische Wirkung des Antivenins könnte auf M-Kresol zurückzuführen sein. Abd-Elsalam et al. betonen in ihrer Studie aus dem Jahr 2011, dass Additive in Antiveninen, wie M-Kresol, auf eine Konzentration minimiert werden sollten, ohne die konservierende und antimikrobielle Wirkung von M-Kresol zu verlieren. Der FET liefert in dieser Studie keine verwertbaren EC50-Ergebnisse. Die In-vitro-Methoden und Tierversuche bleiben weiterhin das Mittel der Wahl. Polyvalente Antivenine neutralisieren i.d.R. Venine verwandter Schlangenarten mit unterschiedlicher Effizienz. Die moderne Veninforschung liefert die Grundlage passgenauere Antivenine auf der Basis komplexer Wirkungszusammenhänge zu konzipieren. Die klassischen Antivenine auf Basis von Antikörpern immunisierter Nutztiere können so durch neue Ansätze ergänzt oder sogar ersetzt werden. Ein Beispiel ist die Studie von Anderson et al. (2018) zum Einsatz von Mastzellen als Alternative zum klassischen Antivenin. In ihrer Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Fischembryo-Assay mit ganzen Veninen humane Mastzellen einen Neutralisationseffekt bei unterschiedlichen Giften besitzen und so eine Berechnung von EC50-Werten im FET möglich war.

5 Zusammenfassung

Ausgehend von der Fragestellung, inwieweit der FET eine Alternative zum Tierversuch an Mäusen bei der präklinischen Testung von Antiveninen darstellen könnte, wurde eine Versuchskonzeption mit fünf Veninen und dem polyvalenten Antivenin PSASA methodisch entwickelt. Über die Bestimmung der mittleren letalen Konzentration sowie der mittleren effektiven Konzentration sollte die Neutralisationskapazität des Antivenins ermittelt werden.

Die Bestimmung der mittleren LC50-Konzentrationen mithilfe von logarithmischen, gefolgt von halbierenden Verdünnungsreihen erwies sich im Rahmen dieser Konzeption als erfolgreich. Auf die zeitaufwendige Dechorionisierung der Fischembryonen (48 hpf) konnte durch den Einsatz bereits geschlüpfter Fischembryonen (72 hpf) verzichtet werden. Die statistische Analyse zeigte eine gute Anpassbarkeit und Reproduzierbarkeit der Versuchsreihen. Die LC50-Konzentrationen für alle fünf Venine wiesen sehr hohe Werte im FET im Vergleich zu den bekannten LD50-Konzentrationen bei Mäusen auf. Nicht nur ein Verdünnungseffekt im wässrigen Milieu, auch eine verminderte Biotransformationskapazität der Fischembryonen, der Expositionsweg über die Haut sowie Unterschiede in der Absorption chemischer Substanzen durch die Fischembryonen werden in der Literatur als mögliche Ursachen für diese Unterschiede in der Toxizität im Vergleich zu Tierversuchen diskutiert und können als Erklärungsansätze herangezogen werden.

Die Überlebenszeitanalysen zeigen, mit Ausnahme des Giftes der *Vipera ammodytes*, dass unter niedrigen Veninkonzentrationen, die gesamte Population mindestens 24 Stunden überlebt, unter hohen Konzentrationen die gesamte Population innerhalb weniger Stunden verstirbt. Dies könnte, ähnlich wie bei den Beobachtungen von Chan et al. (2017), auf einen Alles-oder-Nichts-Mechanismus bei der Giftwirkung auf die Fischembryonen hindeuten.

Im Vergleich sind die LC50-Werte für alle fünf Venine in dieser Studie deutlich höher als die Angaben zu den LD50-Konzentrationen von Latoxan, die auf Tierversuchen mit Mäusen basieren. Erkennbar ist aber, dass übereinstimmend in

beiden Versuchstypen die Werte der zwei *Naja*-Arten deutlich niedriger ausfallen als Werte der Viperngifte *Crotalus atrox* und *Bitis arietans*, zum anderen die Werte der *Vipera ammodytes* im Bereich der Elapidengifte angesiedelt sind. Ob auf Sicht eine Korrelation zwischen den Konzentrationsbereichen von Veninen im FET und im Tierversuch dargestellt werden kann, lässt sich nicht abschätzen. Bei den *Naja*-Giften und *Vipera ammodytes* wurden bei den Fischembryonen nach Exposition unkontrollierte Zuckungen im subletalen Bereich beobachtet, ein mögliches Indiz für eine neurotoxische Wirkung. Die neurotoxische Wirkung von Elapidengiften durch einen hohen Anteil an 3FTxen ist hinreichend bekannt. Nach neueren Erkenntnissen enthält das Viperngift *Vipera ammodytes* mit nicht enzymatischem PLA2 ebenfalls neurotoxische Komponenten. Unsere beschriebenen Beobachtungen könnten als Indiz für die Sensitivität des FETs bei neurotoxischen Substanzen gelten.

Ein Neutralisationseffekt der dreifachen LC50-Konzentration von *Naja haje* über einen Zeitraum von 24 Stunden durch das Antivenin PSASA wurde bei keiner Konzentration der hergestellten Antivenin-Verdünnungsreihen erzielt. Der modifizierte Versuch mit der Antivenin- und einer Venin-Verdünnungsreihe zeigte einen marginalen Neutralisationseffekt für ein Zeitfenster von maximal drei Stunden bei einer Veninkonzentration von 1.330 ng/μl und niedrigen Antiveninkonzentrationen. Hohe Antiveninkonzentrationen wirkten additiv toxisch. Auch der Konservierungsstoff M-Kresol mit moderat fischtoxischer Wirkung, könnte die Toxizität verstärkt haben. Der FET lieferte in dieser Studie keine verwertbaren EC50-Ergebnisse und kann nicht als Alternative zum Tierversuch in der präklinischen Testung von Antiveninen betrachtet werden. Grundsätzlich sollte der Einsatz des FETs als Alternative zum Tierversuch weiter geprüft werden. Die Auswirkungen der Toxizität chemischer Substanzen auf den Organismus der Fischembryonen ist noch nicht vollständig verstanden. Weitere FETs mit einer engeren Abstufung der Venin- und Antivenin-Verdünnungsreihen zur Prüfung der Neutralisationskapazität sowie eine Ausweitung der Testreihen auf mehrere Antivenine sollten Gegenstand weiterer Studien sein.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mischverhältnis Venin und lyophilisiertes Antivenin (AV) des EC50-Versuches	25
Abb. 2: Verteilung der Verdünnungsstufen des Venins und des unbehandelten Antivenins (AV) auf der Mikrotiterplatte	27
Abb. 3: FE, 72 hpf, regelhafte Entwicklung von Augen, Herz, Dottersack und Rückenmark	29
Abb. 4: FE, 72 hpf, regelhafte Entwicklung der Brustflossen	29
Abb. 5: Saumbildung und Krümmung letaler FE	29
Abb. 6: Zersetzungsprozess und Verlust Pigmentierung letaler FE	29
Abb. 7: Überlebenszeitanalyse logarithmische Verdünnungsreihe (in ng/μl) <i>Crotalus atrox</i> (je 12 FE aus Chorionhülle entfernt, 48 hpf) mit Zwischenstufen (je 4 FE aus Chorionhülle entfernt, 48 hpf)	34
Abb. 8: Überlebenszeitanalyse erweiterte halbierende Verdünnungsreihe (in ng/μl) <i>Naja naja</i> (FE aus Chorionhülle geschlüpft, 72 hpf)	34
Abb. 9: Überlebenszeitanalyse logarithmische Verdünnungsreihe <i>Vipera ammodytes</i> (FE aus Chorionhülle geschlüpft, 72 hpf)	35
Abb. 10: Überlebenszeitanalyse logarithmische Verdünnungsreihe (in ng/μl) <i>Naja haje</i> (FE aus Chorionhülle geschlüpft, 72 hpf)	35
Abb. 11: Überlebenszeitanalyse logarithmische Verdünnungsreihe (in ng/μl) <i>Bitis arietans</i> (FE aus Chorionhülle geschlüpft, 72 hpf)	36
Abb. 12: Stadium I <i>Naja naja</i> Konzentration 24,414 ng/μl, direkt nach Giftzugabe	46
Abb. 13: Stadium II <i>Naja naja</i> Konzentration 24,414 ng/μl, 2 h nach Giftzugabe	46
Abb. 14: Stadium III <i>Naja naja</i> Konzentration 24,414 ng/μl, 24 h nach Giftzugabe	46
Abb. 15: Stadium I <i>Bitis arietans</i> mit Tween20 Konzentration 7.500 ng/μl, 1,5 h nach Giftzugabe	47

Abb. 16: Stadium III <i>Bitis arietans</i> mit Tween20 Konzentration 7.500 ng/μl, 2 h nach Giftzugabe	47
Abb. 17: Stadium III (wolkig) <i>Bitis arietans</i> Konzentration 7.500 ng/μl mit Tween20, 24 h nach Giftzugabe	47
Abb. 18: Stadium I <i>Vipera ammodytes</i> Konzentration 7.500 ng/μl, direkt nach Giftzugabe	47
Abb. 19: Stadium III <i>Vipera ammodytes</i> Konzentration 7.500 ng/μl, 30 min nach Giftzugabe	47
Abb. 20: Stadium III (wolkig) <i>Vipera ammodytes</i> Konzentration 7.500 ng/μl, 24 h nach Giftzugabe	47
Abb. 21: Stadium II-III <i>Naja haje</i> Konzentration 1.000 ng/μl, direkt nach Giftzugabe	48

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Logarithmische Verdünnungsreihe der Venine	18
Tabelle 2: Halbierende Verdünnungsreihe der Venine	19
Tabelle 3: Verdünnungsreihe Tween20.....	22
Tabelle 4: Toxizität Tween20.....	22
Tabelle 5: Verdünnungsreihe des Venins der <i>Bitis arietans</i> mit Tween20.....	23
Tabelle 6: Logarithmische Verdünnungsreihe des lyophilisierten Antivenins ...	24
Tabelle 7: Herstellung der Endkonzentration des Venins der <i>Naja haje</i>	25
Tabelle 8: Logarithmische Verdünnungsreihe des unbehandelten Antivenins .	26
Tabelle 9: Logarithmische Verdünnungsreihe des Venins der <i>Naja haje</i>	27
Tabelle 10: Statistische Berechnungen der Venine der <i>Crotalus atrox</i> , <i>Naja naja</i> , <i>Vipera ammodytes</i> , <i>Naja haje</i> und <i>Bitis arietans</i>	37
Tabelle 11: Letalitätsraten (in %) des lyophilisierten und des unbehandelten Antivenins (in µg/µl).....	39
Tabelle 12: Letalitätsraten (in %) der dreifachen LC50-Konzentration des Venins der <i>Naja haje</i> und logarithmischer Verdünnungsreihe aus lyophilisiertem Antivenin (in µg/µl)	40
Tabelle 13: Letalitätsraten (in %) der dreifachen LC50-Konzentration des Venins der <i>Naja haje</i> und logarithmischer Verdünnungsreihe aus unbehandeltem Antivenin (in µg/µl)	41
Tabelle 14: Letalitätsraten (in %) der fünf Veninkonzentrationen 13.300 ng/µl bis 1,33 ng/µl nach Zugabe der fünf Antiveninkonzentrationen 26,78 µg/µl bis 0,002678 µg/µl	42
Tabelle 15: Vergleich der LC50-Konzentrationen des Venins der <i>Naja haje</i> (in ng/µl) ohne Zugabe von Antivenin und nach Zugabe verschiedener Antiveninkonzentrationen	43
Tabelle 16: pH-Wert-Messungen E2-Medium, Venin der <i>Naja haje</i> und Antivenin.....	44

Tabelle 17: Darstellung des subletalen Konzentrationsbereichs und Auswirkungen der fünf Venine (<i>Crotalus atrox</i> , <i>Naja naja</i> , <i>Vipera ammodytes</i> , <i>Naja haje</i> und <i>Bitis arietans</i>) auf die Vitalfunktionen der Fischembryonen.....	45
Tabelle 18: Stadien des Erscheinungsbildes der letalen Fischembryonen nach Giftzugabe	46
Tabelle 19: Vergleich der LD50-Werte (in mg/kg, intravenöse Verabreichung im Tierversuch) und LC50-Konzentrationen (in mg/l, FET)	55

7 Literaturverzeichnis

- ABD-ELSALAM, M., ABDOON, N. & AL-AHAIDIB, M. 2011. What is the optimum concentration of m-cresol in antivenoms? *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17, 12-22.
- ALI, S., VAN MIL, H. G. & RICHARDSON, M. K. 2011. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. *PLoS one*, 6, e21076.
- AMARAL, C. F., CAMPOLINA, D., DIAS, M. B., BUENO, C. M. & REZENDE, N. A. 1998. Tourniquet ineffectiveness to reduce the severity of envenoming after *Crotalus durissus* snake bite in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Toxicon*, 36, 805-8.
- ANDERSON, E., STAVENHAGEN, K., KOLARICH, D., SOMMERHOFF, C. P., MAURER, M. & METZ, M. 2018. Human Mast Cell Tryptase Is a Potential Treatment for Snakebite Envenoming Across Multiple Snake Species. *Front Immunol*, 9, 1532.
- ARAUJO, H. P., BOURGUIGNON, S. C., BOLLER, M. A., DIAS, A. A., LUCAS, E. P., SANTOS, I. C. & DELGADO, I. F. 2008. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: the national control laboratory experience between 2000 and 2006. *Toxicon*, 51, 502-14.
- ATANASOV, V. N., STOYKOVA, S., GORANOVA, Y., MITEWA, M. & PETROVA, S. 2012. Acute toxicity of vipoxin and its components: is the acidic component an "inhibitor" of PLA2 toxicity? *Interdiscip Toxicol*, 5, 169-72.
- AVDESH, A., CHEN, M., MARTIN-IVERSON, M. T., MONDAL, A., ONG, D., RAINEY-SMITH, S., TADDEI, K., LARDELLI, M., GROTH, D. M., VERDILE, G. & MARTINS, R. N. 2012. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *J Vis Exp*, e4196.
- BERTRAND, J. Y. & TRAVER, D. 2009. Hematopoietic cell development in the zebrafish embryo. *Curr Opin Hematol*, 16, 243-8.
- BICKLER, P. E. 2020. Amplification of Snake Venom Toxicity by Endogenous Signaling Pathways. *Toxins*, 12, 68.
- BRAND, M., GRANATO, M. & NUESSELEIN-VOLHARD, C. Keeping and raising zebrafish. 2002.
- BRAUNBECK, T. 2012. *Der Fischembryotest als Alternativmethode für den akuten Fischtest-abschließend notwendige Laboruntersuchungen und Datenanalysen zur Validierung des Fischembryotests für das OECD Prüfrichtlinienprogramm: FKZ 3708 65 400*, Center for Organismal Studies, Universität Heidelberg.
- BUSQUET, F., STRECKER, R., RAWLINGS, J. M., BELANGER, S. E., BRAUNBECK, T., CARR, G. J., CENIJN, P., FOCHTMAN, P., GOURMELON, A., HÜBLER, N., KLEENSANG, A., KNÖBEL, M., KUSSATZ, C., LEGLER, J., LILLICRAP, A., MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F., POLLEICHTNER, C., RZODECZKO, H., SALINAS, E., SCHNEIDER, K. E., SCHOLZ, S., VAN DEN BRANDHOF, E. J., VAN DER VEN, L. T., WALTER-ROHDE, S., WEIGT, S., WITTERS, H. & HALDER, M. 2014. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regul Toxicol Pharmacol*, 69, 496-511.
- CALVETE, J. J. 2017. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochem J*, 474, 611-634.

- CASEWELL, N. R., AL-ABDULLA, I., SMITH, D., COXON, R. & LANDON, J. 2014. Immunological cross-reactivity and neutralisation of European viper venoms with the monospecific *Vipera berus* antivenom ViperaTAb. *Toxins (Basel)*, 6, 2471-82.
- CASEWELL, N. R., COOK, D. A., WAGSTAFF, S. C., NASIDI, A., DURFA, N., WÜSTER, W. & HARRISON, R. A. 2010. Pre-clinical assays predict pan-African Echis viper efficacy for a species-specific antivenom. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e851.
- CHAN, J. Y., ZHOU, H., KWAN, Y. W., CHAN, S. W., RADIS-BAPTISTA, G. & LEE, S. M. 2017. Evaluation in zebrafish model of the toxicity of rhodamine B-conjugated crotamine, a peptide potentially useful for diagnostics and therapeutics. *J Biochem Mol Toxicol*, 31.
- CHANG, C. 1962. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch Pharmacodyn Ther*, 144, 241-257.
- CHENG, M. & KLIGERMAN, A. D. 1984. Evaluation of the genotoxicity of cresols using sister-chromatid exchange (SCE). *Mutat Res*, 137, 51-5.
- CHIPPAUX, J. P. 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ*, 76, 515-24.
- CHIPPAUX, J. P. 2008. Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. *PLoS Med*, 5, e221.
- DAVIDSON, A. J. & ZON, L. I. 2004. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene*, 23, 7233-46.
- DE SILVA, H. A., PATHMESWARAN, A., RANASINHA, C. D., JAYAMANNE, S., SAMARAKOON, S. B., HITTHARAGE, A., KALUPAHANA, R., RATNATILAKA, G. A., ULUWATTHAGE, W., ARONSON, J. K., ARMITAGE, J. M., LALLOO, D. G. & DE SILVA, H. J. 2011. Low-dose adrenaline, promethazine, and hydrocortisone in the prevention of acute adverse reactions to antivenom following snakebite: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Med*, 8, e1000435.
- DE SILVA, H. A., RYAN, N. M. & DE SILVA, H. J. 2016. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *Br J Clin Pharmacol*, 81, 446-52.
- DUCHARME, N. A., REIF, D. M., GUSTAFSSON, J.-A. & BONDESSON, M. 2015. Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: implications for chemical testing. *Reproductive Toxicology*, 55, 3-10.
- ENGESZER, R. E., PATTERSON, L. B., RAO, A. A. & PARICHY, D. M. 2007. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, 4, 21-40.
- GASANOV, S. E., DAGDA, R. K. & RAEL, E. D. 2014. Snake venom cytotoxins, phospholipase A2s, and Zn²⁺-dependent metalloproteinases: mechanisms of action and pharmacological relevance. *Journal of clinical toxicology*, 4, 1000181.
- GOLD, B. S., DART, R. C. & BARISH, R. A. 2002. Bites of venomous snakes. *N Engl J Med*, 347, 347-56.
- GREGORY, S. M., CAVENAUGH, A., JOURNIGAN, V., POKORNY, A. & ALMEIDA, P. F. 2008. A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. *Biophysical journal*, 94, 1667-1680.

- GUPTA, S., ASHRITH, G., CHANDRA, D., GUPTA, A. K., FINKEL, K. W. & GUNTUPALLI, J. S. 2008. Acute phenol poisoning: a life-threatening hazard of chronic pain relief. *Clin Toxicol (Phila)*, 46, 250-3.
- GUTIÉRREZ, J. M., CALVETE, J. J., HABIB, A. G., HARRISON, R. A., WILLIAMS, D. J. & WARRELL, D. A. 2017a. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17063.
- GUTIÉRREZ, J. M., LEÓN, G., LOMONTE, B. & ANGULO, Y. 2011. Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 10, 369-80.
- GUTIÉRREZ, J. M., SOLANO, G., PLA, D., HERRERA, M., SEGURA, Á., VARGAS, M., VILLALTA, M., SÁNCHEZ, A., SANZ, L., LOMONTE, B., LEÓN, G. & CALVETE, J. J. 2017b. Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins (Basel)*, 9.
- HASANIN, S. & FOUAD, I. 2009. Effects of Long-term Exposure to m-Cresol on the Quality of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Global Veterinaria*, 3, 434-440.
- HIFUMI, T., SAKAI, A., KONDO, Y., YAMAMOTO, A., MORINE, N., ATO, M., SHIBAYAMA, K., UMEZAWA, K., KIRIU, N., KATO, H., KOIDO, Y., INOUE, J., KAWAKITA, K. & KURODA, Y. 2015. Venomous snake bites: clinical diagnosis and treatment. *J Intensive Care*, 3, 16.
- HOWE, K., CLARK, M. D., TORROJA, C. F., TORRANCE, J., BERTHELOT, C., MUFFATO, M., COLLINS, J. E., HUMPHRAY, S., MCLAREN, K., MATTHEWS, L., MCLAREN, S., SEALY, I., CACCAMO, M., CHURCHER, C., SCOTT, C., BARRETT, J. C., KOCH, R., RAUCH, G. J., WHITE, S., CHOW, W., KILIAN, B., QUINTAIS, L. T., GUERRA-ASSUNÇÃO, J. A., ZHOU, Y., GU, Y., YEN, J., VOGEL, J. H., EYRE, T., REDMOND, S., BANERJEE, R., CHI, J., FU, B., LANGLEY, E., MAGUIRE, S. F., LAIRD, G. K., LLOYD, D., KENYON, E., DONALDSON, S., SEHRA, H., ALMEIDA-KING, J., LOVELAND, J., TREVANION, S., JONES, M., QUAIL, M., WILLEY, D., HUNT, A., BURTON, J., SIMS, S., MCLAY, K., PLUMB, B., DAVIS, J., CLEE, C., OLIVER, K., CLARK, R., RIDDLE, C., ELLIOT, D., THREADGOLD, G., HARDEN, G., WARE, D., BEGUM, S., MORTIMORE, B., KERRY, G., HEATH, P., PHILLIMORE, B., TRACEY, A., CORBY, N., DUNN, M., JOHNSON, C., WOOD, J., CLARK, S., PELAN, S., GRIFFITHS, G., SMITH, M., GLITHERO, R., HOWDEN, P., BARKER, N., LLOYD, C., STEVENS, C., HARLEY, J., HOLT, K., PANAGIOTIDIS, G., LOVELL, J., BEASLEY, H., HENDERSON, C., GORDON, D., AUGER, K., WRIGHT, D., COLLINS, J., RAISEN, C., DYER, L., LEUNG, K., ROBERTSON, L., AMBRIDGE, K., LEONGAMORNLETT, D., MCGUIRE, S., GILDERTHORP, R., GRIFFITHS, C., MANTHRAVADI, D., NICHOL, S., BARKER, G., et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496, 498-503.
- JUSTIZ VAILLANT, A. A., VASHISHT, R. & ZITO, P. M. 2020. Immediate Hypersensitivity Reactions. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.
- KAIS, B., SCHNEIDER, K., KEITER, S., HENN, K., ACKERMANN, C. & BRAUNBECK, T. 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic toxicology*, 140, 229-238.
- KANJI, S. & CHANT, C. 2010. Allergic and hypersensitivity reactions in the intensive care unit. *Crit Care Med*, 38, S162-8.

- KASTURIRATNE, A., WICKREMASINGHE, A. R., DE SILVA, N., GUNAWARDENA, N. K., PATHMESWARAN, A., PREMARATNA, R., SAVIOLI, L., LALLOO, D. G. & DE SILVA, H. J. 2008. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*, 5, e218.
- KHANBASHI, S., KHODADADI, A., ASSAREHZADEGAN, M. A., PIPELZADEH, M. H., VAZIRIANZADEH, B., HOSSEINZADEH, M., RAHMANI, A. H. & ASMAR, A. 2015. Assessment of immunogenic characteristics of *Hemiscorpius lepturus* venom and its cross-reactivity with venoms from *Androctonus crassicauda* and *Mesobuthus eupeus*. *J Immunotoxicol*, 12, 217-22.
- KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., ULLMANN, B. & SCHILLING, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203, 253-310.
- KLASSE, P. J. 2014. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Adv Biol*, 2014.
- KUNZE, M. 2007. *Hyaluronidasen aus Schlangengiften – Biochemische Charakterisierung und Testung von Hyaluronidase-Inhibitoren*. Universität Leipzig.
- LATOXAN. 2012a. SAFETY DATA SHEET Pure Venom of *Crotalus atrox* Viperidae (Crotalinae), Product code: L1216 [Online]. Available: https://www.latoxan.com/venoms_product.php?id=271&n=10&t=1 [Accessed 20.01.21].
- LATOXAN. 2012b. SAFETY DATA SHEET Pure venom of *Bitis arietans*, Viperidae (Viperinae), Product code: L1159B [Online]. Available: https://www.latoxan.com/venoms_product.php?id=1210&n=0&t=1 [Accessed 20.01.21].
- LATOXAN. 2012c. SAFETY DATA SHEET Pure venom of *Naja atra*, Elapidae, Product code: L1322 [Online]. Available: https://www.latoxan.com/venoms_product.php?id=302&n=3&t=1 [Accessed 20.01.21].
- LATOXAN. 2012d. SAFETY DATA SHEET Pure venom of *Naja haje*, Elapidae, Product code: L1315 [Online]. Available: https://www.latoxan.com/venoms_product.php?id=339&n=4&t=1 [Accessed 20.01.21].
- LATOXAN. 2012e. SAFETY DATA SHEET Pure venom of *Vipera ammodytes ammodytes*, Viperidae (Viperinae), Product code: L1117 [Online]. Available: https://www.latoxan.com/venoms_product.php?id=1234&n=0&t=1 [Accessed 20.01.21].
- LEÓN, G., HERRERA, M., SEGURA, Á., VILLALTA, M., VARGAS, M. & GUTIÉRREZ, J. M. 2013. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon*, 76, 63-76.
- LIN, A. V. 2015a. Direct ELISA. *Methods Mol Biol*, 1318, 61-7.
- LIN, A. V. 2015b. Indirect ELISA. *Methods Mol Biol*, 1318, 51-9.
- LOMONTE, B., FERNÁNDEZ, J., SANZ, L., ANGULO, Y., SASA, M., GUTIÉRREZ, J. M. & CALVETE, J. J. 2014. Venomous snakes of Costa Rica: biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *J Proteomics*, 105, 323-39.

- LUNDQUIST, A. L., CHARI, R. S., WOOD, J. H., MILLER, G. G., SCHAEFER, H. M., RAIFORD, D. S., WRIGHT, K. J. & GORDEN, D. L. 2007. Serum sickness following rabbit antithymocyte-globulin induction in a liver transplant recipient: case report and literature review. *Liver Transpl*, 13, 647-50.
- MANGIN, M. C. M. 2004. *Entwicklung eines ELISA-basierten Neutralisationstests zur Untersuchung der CMV-spezifischen Immunantwort stammzelltransplantierter Patienten nach adoptivem Immuntransfer*. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- MATTINGLY, C. J. & TOSCANO, W. A. 2001. Posttranscriptional silencing of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Dev Dyn*, 222, 645-54.
- MEBS, D. 2010. *Was sind Gifttiere? Ein Handbuch für Biologen, Toxikologen, Ärzte und Apotheker*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- MEYER, B. K., NI, A., HU, B. & SHI, L. 2007. Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. *J Pharm Sci*, 96, 3155-67.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON DEVELOPMENTAL, T. 2000. *Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment*. Washington (DC): National Academies Press (US).
- OECD 2013. *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*.
- OJEDA, P. G., RAMÍREZ, D., ALZATE-MORALES, J., CABALLERO, J., KAAS, Q. & GONZÁLEZ, W. 2018. Computational studies of snake venom toxins. *Toxins*, 10, 8.
- PELKA, K. E., HENN, K., KECK, A., SAPEL, B. & BRAUNBECK, T. 2017. Size does matter - Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat Toxicol*, 185, 1-10.
- POUGH, H. F., ANDREWS, R. M., CADLE, J. E., CRUMP, M. L., SAVITSKY, A. H. & WELLS, K. D. 2004. *Herpetology*, Upper Saddle River, NJ : Pearson, Prentice Hall.
- RAKERS, S. A. 2012. *Anwendungspotentiale multipotenter Zellen aus der Regenbogenforellenhaut: Zellkulturen, Zytotoxizität und dreidimensionale Zellkultur*, Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften.
- RODRIGUES-SILVA, R., ANTUNES, G. F., VELARDE, D. T. & SANTORO, M. M. 1999. Thermal stability studies of hyperimmune horse antivenoms. *Toxicon*, 37, 33-45.
- SCHEITZA, S. 2013. *Die Rolle von Gremlin-1 für die kardiale Entwicklung im Zebrafischembryo*. Universität Tübingen.
- 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*, 22, 12-19.
- SEGURA, A., HERRERA, M., GONZÁLEZ, E., VARGAS, M., SOLANO, G., GUTIÉRREZ, J. M. & LEÓN, G. 2009. Stability of equine IgG antivenoms obtained by caprylic acid precipitation: towards a liquid formulation stable at tropical room temperature. *Toxicon*, 53, 609-15.
- SHIMIZU, S. 2004. Routes of Administration. The laboratory mouse. Amsterdam.
- SIPES, N. S., PADILLA, S. & KNUDSEN, T. B. 2011. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 93, 256-67.

- SOBANSKA, M., SCHOLZ, S., NYMAN, A. M., CESNAITIS, R., GUTIERREZ ALONSO, S., KLÜVER, N., KÜHNE, R., TYLE, H., DE KNECHT, J., DANG, Z., LUNDBERGH, I., CARLON, C. & DE COEN, W. 2018. Applicability of the fish embryo acute toxicity (FET) test (OECD 236) in the regulatory context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). *Environ Toxicol Chem*, 37, 657-670.
- SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C. & SMITH, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, 83, 13-34.
- ŠRIBAR, J., KOVAČIČ, L., OBERČKAL, J., IVANUŠEC, A., PETAN, T., FOX, J. W. & KRIŽAJ, I. 2019. The neurotoxic secreted phospholipase A 2 from the *Vipera a. ammodytes* venom targets cytochrome c oxidase in neuronal mitochondria. *Scientific reports*, 9, 1-12.
- STRÄHLE, U., SCHOLZ, S., GEISLER, R., GREINER, P., HOLLERT, H., RASTEGAR, S., SCHUMACHER, A., SELDERSLAGHS, I., WEISS, C., WITTERS, H. & BRAUNBECK, T. 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol*, 33, 128-32.
- STRONG, P. N., GOERKE, J., OBERG, S. G. & KELLY, R. B. 1976. beta-Bungarotoxin, a pre-synaptic toxin with enzymatic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73, 178-182.
- TASOULIS, T. & ISBISTER, G. K. 2017. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9, 290.
- THE LANCET, J. 2017. Snake-bite envenoming: a priority neglected tropical disease. *Lancet*, 390, 2.
- THEAKSTON, R. D. & WARRELL, D. A. 2000. Crisis in snake antivenom supply for Africa. *Lancet*, 356, 2104.
- TURNER, P. V., BRABB, T., PEKOW, C. & VASBINDER, M. A. 2011. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 50, 600-13.
- VARGAS, M., SEGURA, Á., VILLALTA, M., HERRERA, M., GUTIÉRREZ, J. M. & LEÓN, G. 2015. Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two phase system as a primary purification step. *Biologicals*, 43, 37-46.
- WESTERFIELD, M. 1995. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*, University of Oregon press.
- WESTERFIELD, M. 2000. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio). 4th ed.*, Eugene, University of Oregon Press.
- WILLIAMS, D. J., FAIZ, M. A., ABELA-RIDDER, B., AINSWORTH, S., BULFONE, T. C., NICKERSON, A. D., HABIB, A. G., JUNGHANSS, T., FAN, H. W., TURNER, M., HARRISON, R. A. & WARRELL, D. A. 2019. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLoS neglected tropical diseases*, 13, e0007059-e0007059.
- WILLIAMS, D. J., GUTIÉRREZ, J. M., CALVETE, J. J., WÜSTER, W., RATANABANANGKON, K., PAIVA, O., BROWN, N. I., CASEWELL, N. R., HARRISON, R. A., ROWLEY, P. D., O'SHEA, M., JENSEN, S. D., WINKEL, K. D. & WARRELL, D. A. 2011. Ending the

- drought: new strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *J Proteomics*, 74, 1735-67.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. 2016. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunglobulins. Geneva, Switzerland
- ZHOU, G. & ZHAO, Q. 2020. Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Int J Biol Sci*, 16, 1718-1723.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Dermatologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung durch meinen Doktorvater Prof. Dr. Thomas Kurt Eigentler und zusätzlicher Betreuung von Herrn Dr. Jörg Fischer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Fischer. Die Versuche wurden, nach Einarbeitung durch Frau Birgit Fehrenbacher (Medizinisch-Technische Assistentin), von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde von mir unter Anleitung von Herrn Dr. Fischer erhoben.

Ich versichere das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 01.04.2021

Elisabeth Christina Berger

9 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Eigentler und bei Herrn Dr. Fischer für die Themenformulierung und ihre immer gewährte Unterstützung sowie ihre Anregungen bei der Verfassung dieser Promotionsschrift bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Irion für die Bereitstellung der Zebrafischembryonen aus dem Max-Planck-Institut Tübingen, sowie Herrn Dr. Eyer aus dem Klinikum rechts der Isar für die Bereitstellung des in dieser Studie verwendeten Antivenins. Mein Dank gilt darüber hinaus Frau Fehrenbacher für ihre Unterstützung im Labor.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders herzlich für die vielseitige Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums danken.