



UNIVERSITEIT ANTWERPEN – FACULTEIT WETENSCHAPPEN

Het potentieel van morfologische en fysiologische informatie voor het classificeren van chemische stoffen in het zebravisembryo

Masterproef ingediend tot het bekomen van de graad van Master in de Biologie, afstudeerrichting: Cel- en systeembio



Evelyn Stinckens

Academiejaar 2012-2013

Promotor: Prof. Dr. Dries Knapen

Copromotor: Dr. An Hagens

m.m.v.: Dr. Lucia Vergauwen

Inhoudsopgave

Dankwoord	IV
Samenvatting.....	V
Abstract	VI
1 Inleiding	1
1.1 Algemene probleemstelling en implementatie van het REACH-beleid	1
1.2 Huidige ontwikkelingstoxiciteitstesten	2
1.3 Alternatieve testsystemen in de ontwikkelingstoxicologie.....	3
1.4 Zebravisembryo's als alternatief modelorganisme	4
1.5 Huidige toxiciteitstesten gebaseerd op zebravisembryo's	7
1.6 Bestaande scoringssystemen en het opstellen van morfologische profielen.....	8
1.7 Uitbreiding van morfologische profilering en haar meerwaarde voor de classificatie van chemische stoffen	10
2 Doelstelling.....	12
3 Materiaal en methoden	13
3.1 Huisvesting en onderhoud zebravissen.....	13
3.2 Collecteren van zebravisembryo's	13
3.3 Teststoffen.....	13
3.4 Blootstellingsconcentraties	14
3.4.1 Voorgaande studie	14
3.4.2 Het berekenen van blootstellingsconcentraties	15
3.5 Blootstelling van de embryo's	17
3.6 Opstellen protocol voor het scoren van zebravisembryo's	17
3.7 Experimentele set-up	19
3.8 Evaluatie van de embryo's	20
3.8.1 Fysiologisch aspect	20
3.8.2 Morfologisch aspect	22
3.9 Data-analyse	23
3.9.1 Verwerking van de morfologische data.....	23
3.9.2 Lengte en fysiologische dataverwerking	24
3.9.3 Clusteringanalyse van de morfologische en fysiologische data	24
4 Resultaten.....	25
4.1 Morfologische beslissingsboom	25
4.2 Morfologische evaluatie.....	26
4.2.1 Morfologische eindpunten in de beslissingsboom.....	26

4.2.2	Lengte	27
4.3	Fysiologische evaluatie	28
4.3.1	Hartslag.....	28
4.3.2	Zwemcapaciteit	29
4.4	Clusteranalyse van de morfologische en fysiologische profielen	31
4.4.1	Clusteranalyse van de morfologische data.....	31
4.4.2	Clusteranalyse van een combinatie van morfologische en fysiologische data	33
4.4.3	Observatie van de verschillende clustermethoden.....	35
4.5	Significance Analysis of Microarrays (SAM-analyse)	35
5	Discussie	36
5.1	Beslissingsboom	37
5.2	Clusteranalyse op basis van de morfologische en fysiologische data	37
5.2.1	Interpretatie van de classificatie van de teststoffen.....	37
5.2.2	Interpretatie van de classificatie op basis van eindpunten.....	40
5.3	Geschiktheid van zebravisembryo's om het teratogeen potentieel in zoogdieren te voorspellen.....	50
6	Besluit en toekomstperspectief	52
7	Afkortingenlijst	54

Dankwoord

Hierbij neem ik de gelegenheid om alle personen te bedanken, die mij het afgelopen jaar geholpen hebben bij het realiseren van deze masterproef.

Mijn eerste dankbetuiging gaat uit naar mijn promotor, Prof. Dr. Dries Knapen en mijn copromotoren, Dr. An Hagens en Dr. Lucia Vergauwen voor de kans die mij werd aangeboden om deze masterproef te kunnen starten. Zij stonden steeds klaar om mijn vragen te beantwoorden en leenden hun tijd en deskundigheid om deze masterproef tot een goed einde te brengen. Hierbij wil ik hen uitdrukkelijk bedanken voor de opbouwende kritieken, aanmoedigen, begeleiding en enthousiasme.

Daarnaast wil ik ook graag Enise Bagci en Evy Verbeuken bedanken voor de begeleiding tijdens het praktische werk van mijn masterproef, waardoor ik vele nieuwe technieken heb bijgeleerd, maar ook voor de aangename sfeer die zij naar voren brachten op het labo.

Verder gaat mijn dank uit naar Nathalie Cop voor de vlotte en leuke samenwerking. Ik bedank haar voor de vele lachmomenten en de toffe gesprekken, maar ook voor de goede verdeling van het werk.

Ook wil ik mijn medestudenten van de afstudeerrichting Biologie bedanken voor de leuke momenten dit afgelopen jaar. Natuurlijk wil ik ook mijn ouders in dit dankwoord vermelden. Zij gaven mij namelijk de mogelijkheid om deze studies te starten en steunden mij zowel financieel als mentaal.

Ten slotte wil ik mijn vriend danken voor zijn steun en aanmoediging en voor de vele ritjes naar het labo.

Voor alle personen die ik niet specifiek vermeld heb, maar mij toch gesteund of onderwezen hebben. Heel veel dank!

Samenvatting

Toxicologen hebben zebravisembryo's reeds vele jaren gebruikt om mechanismen van ontwikkelingstoxiciteit te verhelderen voor een groot aantal chemicaliën.

Hierbij wordt vaak gebruik gemaakt van morfologische afwijkingen, geïnduceerd door teratogene stoffen, om een classificatie van deze stoffen mogelijk te maken. Er is echter nood aan de ontwikkeling van een gestandaardiseerd scoringssysteem, alsook aan een bepaling van de specifieke eindpunten en tijdstippen die bestudeerd dienen te worden. Bovendien leidt het toekennen van een teratogene index en algemene EC- en LC-waarden aan een stof, tot het verlies aan waardevolle informatie door het reduceren van de verschillende parameters tot één waarde. In deze studie wordt een biologisch classificatiesysteem ontwikkeld, waarmee chemische stoffen op een snelle manier geïnclassificeerd kunnen worden op basis van hun morfologische eindpunten. Daarenboven gaat deze studie na of het integreren van de morfologische parameter lengte en hogere fysiologische eindpunten, d.i. hartslag en locomotorische activiteit, een meerwaarde biedt aan het classificatiesysteem.

Ter evaluatie van deze classificatiemethode werden zebravisembryo's blootgesteld aan verschillende chemicaliën, waarna ontwikkelingsparameters geëvalueerd werden, door middel van een zelf ontwikkeld morfologisch scoringssysteem. Resulterende morfologische profielen, specifiek voor elke teststof, vormden de basis van het classificatiesysteem. De hogere fysiologische eindpunten blijken hierbij complementair te zijn aan het basis classificatiesysteem. Daarnaast werd het optimale tijdstip in de ontwikkeling voor de scoring van de embryo's beoordeeld, waaruit blijkt dat 96 hours post fertilization, voor zowel morfologie als fysiologie, een gevoeliger classificatiesysteem realiseert.

Algemeen kan gesteld worden dat deze studie een uniek concept naar voren brengt, waarbij stoffen op basis van morfologische afwijkingen geïnclassificeerd worden. Hiertoe verzorgt de integratie van hogere fysiologische eindpunten niet onmiddellijk een meer robuust classificatiesysteem, maar geven bijkomende informatie voor het classificatiesysteem op basis van morfologie. Bovendien kan dit classificatiesysteem gecombineerd worden met bijkomende biologische parameters, zoals genexpressiedata, waardoor deze methode een groot potentieel vertoont om teratogene stoffen op een snelle en gevoelige manier te identificeren.

Trefwoorden: Zebravisembryo, teratogeniteit, toxiciteitstesten, beslissingsboom, morfologische en fysiologische profilering, classificatie.

Abstract

For many years, toxicologists have used zebrafish embryos to clarify mechanisms of developmental toxicity for many chemicals.

Morphological abnormalities induced by teratogenic substances, are often used in order to realize a classification of these chemicals. However, a standardized scoring system is needed, as well as a determination of the specific endpoints and time points that need to be studied. Furthermore, assigning a teratogenic index and general EC and LC values to a compound, impairs the loss of valuable information by reducing the various parameters to a single value. In this study a biological classification system is developed, by which chemicals can be classified in a swift manner, based on their morphological endpoints. Furthermore this study determines whether an integration of the morphological parameter length and higher physiological endpoints, i.e. heart rate and locomotor activity, adds value to the classification system.

In order to evaluate this classification method, zebrafish embryos were exposed to different chemicals, after which developmental parameters are evaluated by means of a self-developed morphological scoring system. Resulting morphological profiles, specific for each test substance, formed the basis of the classification system. The integration of higher physiological parameters appears to be complementary to this basic classification system. In addition, the optimum time point in the development was assessed for the scoring of embryos, indicating that a more sensitive classification was realized at 96 hours post fertilization, for both morphology and physiology.

Generally it can be stated that this study brings a unique concept forward, in which substances can be classified, based on morphological abnormalities. To this end, the integration of higher physiological endpoints does not immediately produce a more robust classification system, but provides additional information to the classification based on morphology.

Furthermore, additional biological parameters, such as gene expression data, can be integrated, showing the potential of this method to identify teratogenic substances in a rapid and sensitive way.

Keywords: Zebrafish embryo, teratogenicity, toxicity testing, decision tree, morphological and physiological profiling, classification.

1 Inleiding

1.1 Algemene probleemstelling en implementatie van het REACH-beleid

De introductie van chemicaliën in het milieu door menselijke activiteiten houdt een risico in voor de omgeving en de menselijke gezondheid (Scholz et al., 2008; Yang et al., 2009b).

In 2001 heeft de Europese Commissie een beleidsverklaring gepubliceerd over de toekomstige regelgeving en risicoreductie voor chemische stoffen, getiteld: “White Paper: Strategy for a Future Chemicals Policy” (European Commission, 2001). De ontwikkeling van dit chemisch beleid werd gedreven door een onsuccesvolle aanpak voor risicobeheer van de bestaande chemicaliën (Höfer et al., 2004).

Recent werd een nieuw Europees chemisch beleid geïmplementeerd dat bekend staat als REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) (Piersma, 2006). Dit chemisch beleid omvat de registratie, evaluatie en autorisatie van risicovolle stoffen, met een prioriteit voor kankerverwekkende, mutagene en reprotoxische stoffen (Embry et al., 2010; Höfer et al., 2004; Scholz et al., 2008). Met een wetgeving die van kracht ging op 1 juni 2007, tracht REACH de menselijke gezondheid en het milieu te beschermen door een betere en vroegere detectie te realiseren van de intrinsieke eigenschappen van chemische stoffen (<http://ec.europa.eu>).

ECOPA, “The European Consensus Platform on Alternatives”, maakt zich hierbij zorgen over de aanzienlijke toename van het gebruik van proefdieren ten gevolge van de voorgestelde wetgeving (Höfer et al., 2004; <http://ecopa.vub.ac.be>). Uit recente schattingen van het Europees Chemicaliënagentschap (ECHA) blijkt dat (twee-generatie) reproductieve toxiciteitsstudies veruit de meeste proefdieren (61%) en middelen (54%) gebruiken binnen REACH (Piersma, 2006). Hiertoe tracht REACH het gebruik van testen zonder proefdieren en de ontwikkeling van alternatieve strategieën te bevorderen (Embry et al., 2010).

De groeiende inspanningen voor de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven in de ontwikkelingstoxicologie vloeien voort uit het 3V principe, vooropgesteld door Russel en Burch in 1959 (Piersma, 2006; Russel and Burch, 1959). Het 3V principe staat voor de vermindering, verfijning en vervanging van het testen met proefdieren. De bekendheid van dit principe is echter pas recent opgekomen in de milieu-toxicologie (Embry et al., 2010), waardoor het bewustzijn van ethische kwesties met betrekking tot dierproeven dan ook de afgelopen jaren prominenter is geworden (Piersma, 2006).

Hierdoor is er een grote vraag naar robuuste en kosteneffectieve analyses met hoge voorspellende waarde, die minder tijd- en ruimte consumerend zijn (Scholz et al., 2008; Yang et al., 2009b).

1.2 Huidige ontwikkelingstoxiciteitstesten

Aangeboren afwijkingen vormen een ernstig probleem, waardoor 3% van alle menselijke pasgeborenen getroffen worden. Ongeveer 5-10% van deze aangeboren afwijkingen wordt veroorzaakt door teratogene middelen (Selderslaghs et al., 2012).

Teratogene middelen kunnen gedefinieerd worden als stoffen die de normale ontwikkeling van het embryo en/of de foetus verstoren. Vroege levensstadia zijn bijzonder gevoelig aan de nadelige effecten van chemische stoffen, maar net deze stadia zijn het meest ontoegankelijk in de traditionele zoogdiermodellen door de *in utero* ontwikkeling (Yang et al., 2009b). Momenteel ontbreekt hierdoor ongeveer 86% relevante toxiciteitsdata voor bestaande chemicaliën.

De huidige OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) richtlijnen voor het testen van ontwikkelingstoxiciteit voor chemicaliën omvatten een prenatale ontwikkelingstoxiciteitsstudie (TG 414; OECD, 2001a), een voortplantingstoxiciteitsstudie van de eerste generatie (TG 415; OECD, 1983), een voortplantingstoxiciteitsstudie over twee generaties (TG 416; OECD, 2001b), een voortplantings- en ontwikkelingstoxiciteit screeningtest (TG 421; OECD, 1995), een toxicologische studie van herhaalde dosissen gecombineerd met de voortplantings- en ontwikkelingstoxiciteit screeningtest (TG 422; OECD, 1996) en een ontwikkelingsneurotoxiciteitstest (TG 426; OECD, 2005).

Daarnaast zijn er richtlijnen van de Internationale Conferentie over Harmonisatie (ICH) voor het testen van farmaceutische producten (ICH, 2000; Piersma, 2006; Selderslaghs et al., 2012).

De evaluatie van embryotoxiciteit dient, volgens wettelijke richtlijnen, verplicht uitgevoerd te worden in twee soorten (een knaagdier- en een niet-knaagdiersoort) om vals negatieve resultaten te vermijden (Selderslaghs et al., 2012). In praktijk worden de meeste ontwikkelingstoxiciteitstudies met knaagdieren uitgevoerd op ratten, terwijl het konijn vrijwel uitsluitend gebruikt wordt als niet-knaagdiersoort (Daston, 2011).

Fleischer (2007) schatte dat er voor de beoordeling van de ontwikkelingstoxiciteit van één chemische stof volgens de OECD richtlijnen, 5816 proefdieren nodig zouden zijn (Fleischer, 2007; Selderslaghs et al., 2012). Deze *in vivo* studies vereisen dus grote aantallen proefdieren, zijn tijdrovend en duur (Selderslaghs et al., 2012) en bovendien ethisch niet verantwoord

(Höfer et al., 2004). Hierdoor wordt de haalbaarheid van het REACH programma uitgedaagd, maar daarnaast wordt de implementatie van de principes van het 3V beleid aangemoedigd en worden onderzoekers gedwongen alternatieve *in vitro* en *in vivo* methoden te zoeken voor het testen van ontwikkelingstoxiciteit (Höfer et al., 2004; Selderslaghs et al., 2012).

1.3 Alternatieve testsystemen in de ontwikkelingstoxicologie

Onderzoekers streven naar het identificeren en controleren van teratogene gevaren en blootstelling aan zulke agentia bij o.a. vrouwen met een vruchtbare leeftijd. De identificatie van deze teratogene gevaren werd reeds succesvol verwezenlijkt, echter door middel van dure en tijdrovende *in vivo* ontwikkelingstoxiciteitstesten met proefdieren zoals ratten en konijnen. Alternatieve tests zijn hiertoe ontwikkeld en verfijnd om inherente toxische eigenschappen en hun dosis-effect relaties te detecteren (Höfer et al., 2004).

Het Europese Centrum voor de Validatie van Alternatieve Methoden (ECVAM) heeft criteria opgesteld voor een bruikbare, alternatieve teratogeniciteitstest. Deze omvatten kosteneffectiviteit, adequate throughput, een eenvoudig verloop van de assay, reproduceerbaarheid, concordantie met de *in vivo* gegevens van zoogdieren en een betrouwbare extrapolatie tot de mens (Brannen et al., 2010). Hoewel “the White Paper” (European Commission, 2001) en het Europees Parlement (European Parliament, 2001) suggereren dat de testen in eerste instantie beperkt moeten worden tot *in vitro* testen, ontbreekt een algemene consensus over geschikte gevalideerde *in vitro* testen (Höfer et al., 2004).

Bestaande alternatieve methoden voor ontwikkelingstoxiciteitstesten kunnen ruwweg onderverdeeld worden in drie systeemtypes types systemen met toenemende complexiteit: celculturen, orgaanculturen en embryoculturen (Piersma, 2006).

Celculturen hebben het nadeel van eenvoud met de voordelen van gemak van uitvoering, minimaal gebruik van proefdieren en reproduceerbaarheid (Piersma, 2006). Deze *in vitro* systemen zijn echter beperkt door de beschikbaarheid van geschikte cellijnen of primaire cellen. Bovendien zijn de *in vitro* kweekomstandigheden niet in overeenstemming met de omgeving van de natuurlijke cellen in het lichaam (Yang et al., 2009b). Ook de interactie tussen verschillende regulerende mechanismen en patroonvorming in de embryogenese ontbreekt.

Om de complexiteit van patroonvorming *in vitro* te kunnen representeren, werden een reeks van orgaancultuursystemen ontwikkeld als testsystemen. Hiertoe behoren bijvoorbeeld het gebruik van ledemaatknoppen, long-, darm-, en geslachtsorganen (Piersma, 2006).

Het meest uitgebreide beeld van het toxisch effect wordt echter bekomen door “Whole organism” benaderingen, zoals embryocultuursystemen. Deze testen vertegenwoordigen embryogenese in volledige complexiteit, van cellulaire proliferatie en differentiatie tot patroonvorming (Piersma, 2006), maar vereist het gebruik van dierlijk materiaal.

Momenteel zijn er drie gevalideerde alternatieven in de ontwikkelingstoxicologie, waarvoor standaardrichtlijnen beschikbaar zijn op de website van ECVAM (Piersma, 2006; <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>). Hiertoe behoren de embryonale stamcel test (EST) (Spielmann et al., 1997), de zoogdierlijke micromass (MM) test van ledemaatknoten (*Eng. The limb bud micromass*) (Flint and Orton, 1984) en de rat postimplantatie embryocultuur (WEC) (*Eng. The rat postimplantation whole embryo culture*) (New et al., 1976). Deze tests hebben echter geen betrekking op de gehele periode van embryo/fetogenese en beschouwen een beperkt aantal eindpunten in vergelijking met de talrijke processen die plaatsvinden in een ontwikkelend organisme (Piersma, 2006; Selderslaghs et al., 2012). Bovendien maken de twee laatstgenoemde modellen nog steeds gebruik van proefdieren (Piersma, 2006; Selderslaghs et al., 2012).

Naast de ontwikkeling van alternatieve *in vitro* en *in vivo* testsystemen, werd eveneens getracht de toxiciteit te voorspellen op basis van de fysicochemische eigenschappen van de stoffen. Deze theoretische modellen, ook wel (kwantitatieve) structuur-activiteit relaties ((Q)SAR) genoemd, voorspellen de fysicochemische en biologische eigenschappen van moleculen op basis van de chemische structuur (Höfer et al., 2004; Niemelä et al., 2010; Vedani et al., 2006). Deze methoden blijken echter niet altijd effectief in het voorspellen van het werkingsmechanisme en de toxiciteit van chemische stoffen in een organisme. De algemene multi-stage toxicologische processen zijn immers moeilijk te simuleren. Dit geeft aan dat het gebruik van SAR-modellen vooral voorbestemd is om een pre-evaluatie uit te voeren (Höfer et al., 2004).

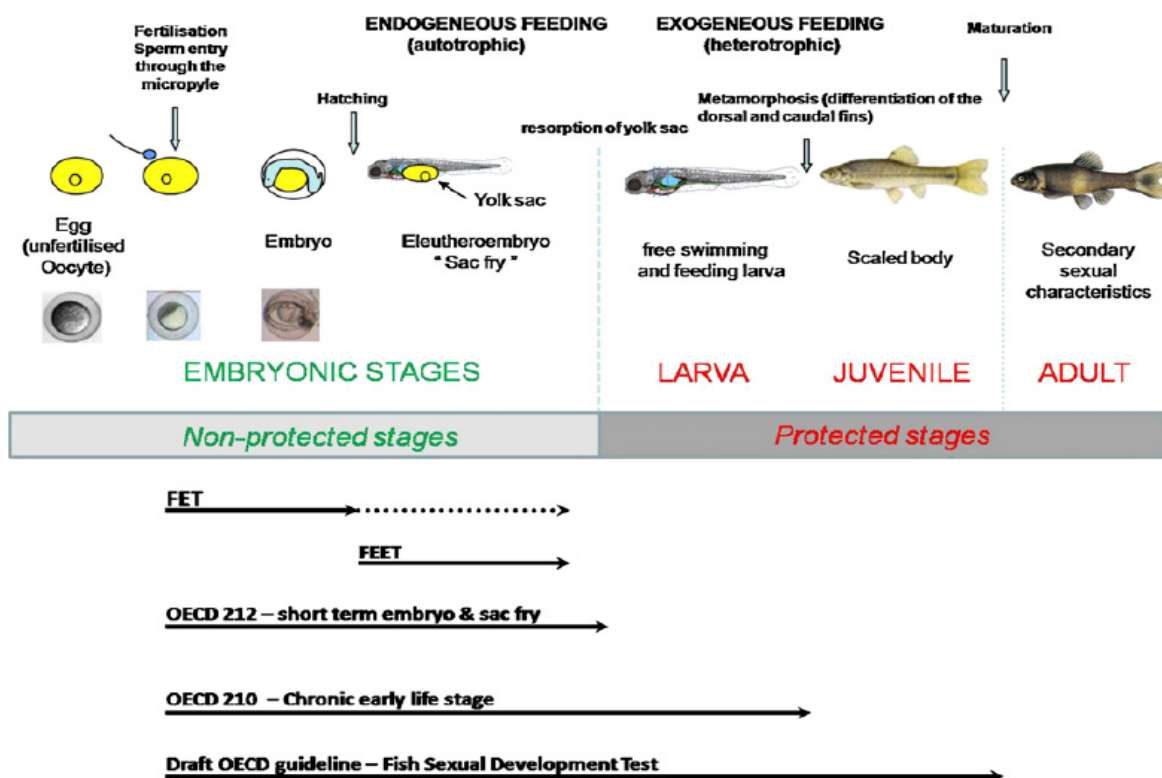
1.4 Zebravisembryo's als alternatief modelorganisme

In tegenstelling tot de bovengenoemde alternatieve testsystemen, bieden de embryo's en niet-voedende larven van de vertebraat zebravis (*Danio rerio*) een goedkoop en effectief alternatief (Yang et al., 2009b). Het gebruik van zebravisembryo's vormt een brug tussen eenvoudige analyses op basis van celkweek en biologische validatie in dieren, zoals knaagdieren (Ali et al., 2011). De zebravis wordt in toenemende mate erkend als een veelbelovend alternatief testmodel voor o.a. knaagdieren, en wordt momenteel gebruikt in

studies naar embryonale ontwikkeling, genetische studies en screening van geneesmiddelen (Ali et al., 2011; Briggs, 2002; Scholz et al., 2008).

Het is een kleine, tropische, zoetwatervis van ongeveer 3 cm lang, oorspronkelijk afkomstig van de rivieren van India en Zuid-Azië, en behoort tot de orde van Cypriniformes (Briggs, 2002; McGrath and Li, 2008; Scholz et al., 2008). Het pionierswerk van George Streisinger en collega's zorgde voor de opkomst van de zebravis als modelorganisme. Zij erkenden immers de vele voordelen verbonden aan deze soort voor experimentele studies (Briggs, 2002). Hiertoe behoren een beperkt onderhoud in het laboratorium, grote productie van eitjes, een externe bevruchting, transparantie van de embryo's en toegang tot experimentele manipulatie (Briggs, 2002; McGrath and Li, 2008).

Het belangrijkste voordeel van het gebruik van zebravisembryo's is dat deze niet beschouwd worden als proefdieren volgens de Europese wetgeving (Ali et al., 2011; European Commission, 2010; Hermsen et al., 2011). ECETOC (2005) ontwikkelde een conceptueel diagram voor de relatie van de levensintervallen, beschermde intervallen, en toxiciteitstestprocedures (Figuur 1).



Figuur 1: Vis levensstadia, beschermingsstatus en de duur van de standaard toxiciteitstesten. Beschrijving van de vis ontwikkelingsstadia in relatie tot de beschermde/ niet-beschermde status en de duur van de standaard toxiciteitstesten. Volle pijlen wijzen op de duur van de proeven waar naar verwezen wordt; de gestippelde pijl geeft de aanvullende duur aan van de uitgebreide FET test, waarin het eleutheroembryo stage vervat zit (Embry et al., 2010).

Totdat de vis een stadium bereikt van exogeen voeden (tot 120 uren na bevruchting voor de zebravis) wordt het beschouwd als embryo of eleutheroembryo, d.i. stadia die niet beschermd worden volgens de huidige Europese richtlijnen 86/609/EEG en 2010/63/EU (Embry et al., 2010; European Commission, 1986; European Commission, 2010).

Zebravissen hebben eveneens een zeer korte voortplantingscyclus, met een geslachtsrijpheid die bereikt wordt op 3 à 4 maanden (Scholz et al., 2008). Een ander voordeel verbonden aan het gebruik van zebravisembryo's, is de rechtstreekse opname van chemicaliën, in tegenstelling tot de ongewervelden die een cuticula bevatten (Goldsmith, 2004; McGrath and Li, 2008). Hierdoor kan de teststof in het omgevende water opgelost worden. De opname van kleine moleculen gebeurt via diffusie doorheen de huid, tot 12-14 dagen na de bevruchting (Goldsmith, 2004), maar kunnen eveneens oraal toegediend worden, vanaf het moment dat de zebravissen starten met slikken op 72 hpf (hours post fertilization) (Goldsmith, 2004; McGrath and Li, 2008). De chorion, waarin het zebravisembryo verblijft tot tenminste 48 hpf, kan echter als barrière optreden voor de opname van chemicaliën met een moleculair gewicht groter dan 3kDa (Ali et al., 2011; Cheng et al., 2007; Creton, 2004). Om het effect van dergelijke stoffen te bestuderen, kan het embryo ontdaan worden van de chorion, d.i. dechorioneren (Braunbeck et al., 2005). Het dechorioneren is echter arbeidsintensief en blijkt voor 24 hpf een negatieve invloed te hebben op de ontwikkeling van de embryo's (Henn and Braunbeck, 2011; Weigt et al., 2011).

De ontwikkelingsstadia werden reeds duidelijk beschreven door o.a. Kimmel et al (Kimmel et al., 1995), waarbij de snelle embryonale ontwikkeling duidelijk wordt. Tien uur na de bevruchting is de gastrulatie vervolledigd, waarna somietvorming plaatsvindt. Het basis bouwplan wordt na 24 hpf aangelegd, waarbij een kloppend hart kan waargenomen worden. Embryo's ontluiken op 2-3 dpf (days post fertilization) (Ali et al., 2011; Scholz et al., 2008) en op 120 hpf, bij volledige dooierconsumptie en start van extern voeden, is de organogenese van de belangrijkste organen en weefsels voltooid (Ali et al., 2011; McGrath and Li, 2008; Scholz et al., 2008). Deze orgaansystemen zijn op zowel anatomisch, fysiologisch als moleculair vlak gelijkaardig aan deze van zoogdieren, zoals het cardiovasculair stelsel, het zenuwstelsel, het excretiestelsel en het gastro-intestinaal stelsel (Brannen et al., 2010). Bijkomend zijn vele fundamentele cellulaire en moleculaire pathways, betrokken in de reactie op chemicaliën of stress, geconserveerd tussen de zebravis en zoogdieren (Ali et al., 2011). De erkenning van het potentieel van het model heeft geleid tot de betrokkenheid van "The Wellcome Trust" en het "Sanger Institute" om het volledige genoom te sequencen (Briggs,

2002). De informatie verkregen uit genexpressieprofielen kan geëxtrapoléerd worden naar de geobserveerde mechanismen van toxiciteit bij de mens, doordat er een conservatie bestaat tussen het genoom van de zebravis en deze van de mens (Ali et al., 2011; Brannen et al., 2010).

Hoewel het basis bouwplan van de zebravis in vele aspecten gelijk op deze van zoogdieren, zijn er echter ook enkele belangrijke verschillen in morfologie. De zebravis is immers ectotherm en mist cardiale septa, synoviale gewrichten, spongieuze botten, ledematen, longen en andere structuren. Om deze reden zijn sommige toxische effecten bij mensen moeilijk te modelleren in de zebravis (Ali et al., 2011). De evolutionaire divergentie van de zebravis en zoogdieren is ongeveer 445 miljoen jaar geleden en het is dus niet zeker dat de mens dezelfde gevoeligheid heeft ontwikkeld voor toxische stoffen als de zebravis.

Daarnaast wordt de embryotoxische activiteit niet altijd veroorzaakt door de uitgangsverbindingen. Deze proteratogenen kunnen omgezet worden tot reactieve metabolieten via oxidatie (Weigt et al., 2011). Cytochroom P450-enzymen (CYPs) vertegenwoordigen de belangrijkste enzymfamilie betrokken in de oxidatie van xenobiotica. Het werd aangetoond dat de zebravisembryo's in staat zijn om proteratogene stoffen te metaboliseren zonder de toevoeging van een exogeen metabool activeringssysteem (Weigt et al., 2012). CYP activiteit en CYP mRNA werd immers gedetecteerd in verschillende ontwikkelingsstadia. Deze metabolische capaciteit kan echter niet gelijk gesteld worden aan deze van volwassen zebravissen, of aan deze van de mens (Weigt et al., 2011). Adulte zebravissen hebben een volledig actief CYP enzymstelsel, in tegenstelling tot zebravisembryo's waarbij slechts een gedeelte van het CYP enzymstelsel tijdelijk tot expressie komt tijdens de embryonale ontwikkeling (Busquet et al., 2008).

1.5 Huidige toxiciteitstesten gebaseerd op zebravisembryo's

Toxicologen hebben zebravisembryo's reeds vele jaren gebruikt om mechanismen van ontwikkelingstoxiciteit te verhelderen voor een groot aantal chemicaliën (Brannen et al., 2010). Huidige richtlijnen betreffende het gebruik van vissen binnen OECD omvatten een acute toxiciteitstest op juveniele vissen (OECD 203, 1992a; *Eng. Fish acute toxicity test*), een vis korte termijn toxiciteitstest op embryo's en kleine larven (OECD 212, 1998; *Eng. Fish short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages*), een vis early-life stage toxiciteitstest (OECD 210, 1992b; FELS), een test in verband met de groei van juveniele vissen (OECD 215, 2000; *Eng. Fish juvenile growth test*) en een bio-accumulatie test (Embry et al., 2010; OECD 305, 1990).

Zebravisembryo's werden in een eerste toepassing gebruikt om een alternatieve test te ontwikkelen voor de 96 uur acute vis toxiciteitstest met adulte vissen (Scholz et al., 2008). De (zebra)visembryo acute toxiciteitstest (Z)FET, met een verwante viseleuthero embryotoxiciteitstest (FEET) zijn twee dergelijke alternatieven (Embry et al., 2010; OECD, 2012). Deze tests winnen aan populariteit doordat ze de mogelijkheid bieden de eerste ontwikkelingsstadia te bestuderen (Hermsen et al., 2011) en werden reeds succesvol toegepast voor een brede waaier aan chemicaliën met diverse werkingsmechanismen, oplosbaarheden, vluchtigheden en hydrofobiciteiten (OECD draft, 2012; OECD 236, 2013).

Tijdens deze experimenten worden pas bevruchte zebraviseitjes blootgesteld aan een toenemende concentratie van de testoplossing voor een periode van 96-120 hpf. Hierbij wordt er elke 24 uur een beoordeling uitgevoerd van de embryonale levensstadia, met mortaliteit als het primaire eindpunt (Embry et al., 2010). Mortaliteit wordt in deze alternatieve tests gedefinieerd als de coagulatie van bevruchte eitjes, een gebrek aan somietvorming, een gebrek aan het loskomen van de staart van de dooierzak (*Eng. Non-detachment of the tail*) of het ontbreken van de hartslag. Op het einde van de blootstellingsperiode wordt de acute toxiciteit bepaald, gebaseerd op het voorkomen van 1 of meer van de 4 bovengenoemde parameters, waaruit een LC50 berekend kan worden. Een LC50 waarde komt hierbij overeen met de concentratie van de testoplossing die leidt tot 50% mortaliteit. Bijkomend wordt op een dagelijkse basis de ontluiking gecontroleerd in zowel de behandelings- als controlegroep vanaf 48 hpf. De ontluiking verzekert de blootstelling van het embryo zonder een potentiële barrièrefunctie van de chorion en kan bijgevolg data interpretatie vergemakkelijken (OECD, 2013).

Een bijkomende kwestie die van cruciaal belang is voor het gebruik van deze alternatieven is de mogelijkheid tot pijn- en/of stressbeleving bij de vissen door de toxiciteitstestprocedures. Er werd echter nog geen consensus bereikt in verband met hoe deze sensaties ervaren kunnen worden door vissen.

1.6 Bestaande scoringssystemen en het opstellen van morfologische profielen

Naast het evalueren van de vier mortaliteitseindpunten in de huidige (Z)FET test, kunnen additionele eindpunten worden toegevoegd, samen met bijkomende tijdspunten waarop deze eindpunten geëvalueerd worden (Embry et al., 2010).

Door de grote verscheidenheid aan scoring- en evaluatiemethodes in verschillende tests die gebruik maken van het zebravisembryo is er nood aan de ontwikkeling van een uniform en

gestandaardiseerd scoringssysteem, alsook een bepaling over de eindpunten en tijdstippen die bestudeerd moeten worden (Hermsen et al., 2011; Teixidó et al., 2012).

Een van de huidige werkwijzen is gebaseerd op het scoren van verschillende eindpunten in de ontwikkeling op een binaire wijze (Hagenaars et al., 2011; OECD, 2012; Selderslaghs et al., 2012; Weigt et al., 2012). Hierbij wordt een score van 0 of 1 toegewezen aan eindpunten die respectievelijk geen of wel een afwijking vertonen (Weigt et al., 2011). Vervolgens worden er dosis-responscurves opgesteld om een enkele EC50 (effect concentratie)- en LC50 (letale concentratie)-waarde te berekenen per te testen stof. Deze gegevens kunnen gebruikt worden om een teratogene index (TI) te berekenen om het potentieel teratogeen karakter van stoffen te voorspellen (Hermsen et al., 2011).

De teratogene index wordt als volgt berekend:

$$TI = \frac{LC50}{EC50}$$

Deze TI werd ontwikkeld op basis van het feit dat teratogene stoffen ontwikkelingsafwijkingen veroorzaken bij een concentratie waar nog geen significante mortaliteit optreedt. Hoewel er nog geen consensus bekomen werd in verband met de drempelwaarde, kan de chemische stof in kwestie als teratogeen beschouwd worden indien een ratio van groter dan 1 bekomen wordt (Hagenaars et al., 2011; Selderslaghs et al., 2012; Weigt et al., 2012).

De eindpunten die worden gebruikt kunnen echter verschillen tussen studies, waardoor de teratogene indices niet rechtstreeks vergeleken kunnen worden (Hermsen et al., 2011). De mortaliteit wordt hierbij niet altijd hetzelfde gedefinieerd, waarbij sommigen mortaliteit definiëren zoals in de richtlijnen van de ZFET test (Hagenaars et al., 2011; OECD, 2013), terwijl anderen coagulatie of het ontbreken van een hartslag observeren (Selderslaghs et al., 2012; Weigt et al., 2012).

Bovendien is er eveneens een verschil waarneembaar in de duur van de zebravisembryotesten (Brannen et al., 2010; Hagenaars et al., 2011; Hermsen et al., 2011; Selderslaghs et al., 2012;; Weigt et al., 2012). Typische tijdstippen die gebruikt worden om een morfologische scoring uit te voeren zijn 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf, 96 hpf en 120 hpf (Selderslaghs et al., 2013; Teixidó et al., 2012; Weigt et al., 2012). Het scoren op verschillende tijdstippen kan een grote invloed hebben op het toxische potentieel dat aan een stof wordt toegekend.

Daarboven leidt het toekennen van een teratogene index aan een stof tot het verlies aan waardevolle informatie door het reduceren van de parameters tot één waarde. Volgens Weigt et al (2011) is het belangrijk om hierbij het type van effect, de intensiteit van het effect en de

concentratie-respons relatie van de teratogene effecten in rekening te brengen (Weigt et al., 2011).

In enkele studies wordt er daarom meer belang gehecht aan de individuele afwijkingen. Teratogene effecten worden hierbij beschouwd als ‘fingerprint endpoints’, als de volgende criteria voldaan zijn: (1) Een concentratie-respons relatie is aanwezig en (2) het specifiek eindpunt moet waargenomen worden in meer dan 50% van alle embryo's die werden blootgesteld aan teratogene stoffen in alle testgroepen van een teststof (Weigt et al., 2011; Weigt et al., 2012).

Indien echter een evaluatie gerealiseerd werd met een binaire scoring, waarbij afwijkingen gescoord worden als “alles of niets”-gebeurtenissen, wordt er geen rekening gehouden met de ernst van de effecten in kwestie (Hermsen et al., 2011). Daarom werd een meer kwantitatieve methode geïntroduceerd door Brannen et al (2010) (Brannen et al., 2010). In deze studie kreeg elke parameter een score toegewezen van 0.5 tot 5, met de laagste score die een sterke afwijking karakteriseert, en de hoogste score overeenkomt met normale anatomische structuren. Vervolgens werd de $\frac{NOAEL}{LC25}$ verhouding berekend om het teratogeen potentieel te onderzoeken (Brannen et al., 2010). Hierbij staat NOAEL voor No Observed Adverse Effect Level en wordt gedefinieerd als de hoogste concentratie waarbij er geen negatieve effecten waargenomen konden worden. Een bepaling van de teratogene index aan de hand van NOAEL concentraties is echter zeer afhankelijk van de gekozen testconcentraties.

Bijkomend werden in de studie van Brannen et al (2010) een groot aantal bijkomende eindpunten geregistreerd (Brannen et al., 2010), waardoor de methode arbeidsintensief wordt en verliest aan objectiviteit door een variatie die kan optreden tijdens het scoren door verschillende individuen (Hermsen et al., 2011).

Om de standaardisering van de scoring te verbeteren, werd er door Hermsen et al. een snelle, maar semi-kwantitatieve, scoringsmethode ontwikkeld die de “General morphology scoring system” (GMS) wordt genoemd. Hierbij krijgt het embryo een score toegewezen afhankelijk van de geobserveerde parameters en het tijdstip in de ontwikkeling (Hermsen et al., 2011).

1.7 Uitbreiding van morfologische profilering en haar meerwaarde voor de classificatie van chemische stoffen

Om de biomonitoring en het voorspellen van de toxiciteit van nieuwe verbindingen in de toekomst te vergemakkelijken, is een grondig mechanistisch begrip van hoe chemicaliën organismen beïnvloeden vereist (Yang et al., 2009b). De werkingsmechanismen van stoffen

zijn vaak karakteristiek voor een specifieke groep van stoffen (Höfer et al., 2004; Niemelä et al., 2010). Hierbij kunnen stoffen geïnclassificeerd worden in biologisch relevante groepen, waardoor het potentieel teratogeen karakter van een nieuwe stof snel en efficiënt bepaald kan worden.

Een eerste methode om stoffen te classificeren gebeurt aan de hand van morfologische profielen, waarbij chemische stoffen worden geclusterd, volgens gelijkaardig gedrag (Rihel et al., 2010). De incorporatie van fysiologische en moleculaire parameters, kan de sensitiviteit en voorspelbaarheid van de test verhogen (Hagenaars et al., 2013). Fysiologische responsen kunnen bestudeerd worden aan de hand van het gedrag en de locomotorische activiteit van de embryo's. Zebravislarven vertonen bijvoorbeeld een schrikreactie bij blootstelling aan tactiele, akoestische of visuele stimuli (Colwill and Creton, 2012). Om de moleculaire werkingsmechanismen in aquatische organismen te bestuderen, kunnen genexpressiepatronen gebruikt worden (Hagenaars et al., 2013).

De combinatie van morfologische, fysiologische en moleculaire data, samen met *in silico* methoden, biedt met andere woorden een potentiële meerwaarde om teratogene stoffen te identificeren.

2 Doelstelling

De doelstelling van deze masterproef is de ontwikkeling van een biologisch classificatiesysteem dat chemische stoffen op een snelle manier kan classificeren. Deze classificatie wordt gebaseerd op het voorkomen van morfologische afwijkingen in zebravisembryo's, geïnduceerd door de verschillende chemicaliën. Hiertoe wordt nagegaan of het integreren van hogere fysiologische eindpunten een meerwaarde biedt aan het classificatiesysteem.

Een eerste luik van deze masterproef bestaat uit het berekenen van blootstellingsconcentraties waaraan de zebravisembryo's blootgesteld zullen worden, waarbij gebruik werd gemaakt van het Lethal en Single Effect Concentration concept, LSECx (Maex, 2012).

Om de effecten van stoffen te karakteriseren wordt in een tweede luik van deze masterproef een morfologisch scoringsysteem ontwikkeld in de vorm van een beslissingsboom, zodat er een eenduidige en gestandaardiseerde handleiding beschikbaar is om een scoring uit te voeren van de blootgestelde embryo's. Er wordt eveneens een dataverwerkingsmethode opgesteld, die toelaat om voor elke teststof een morfologisch profiel samen te stellen.

In het derde luik van deze masterproef wordt een basisclassificatiedataset ontwikkeld door gebruik te maken van de morfologische profielen van enerzijds teratogene stoffen met verschillende biologische werkingsmechanismen en anderzijds niet-teratogene stoffen om een onderscheid in teratogeniteit te kunnen maken. Door een integratie van de morfologische parameter lengte en fysiologische informatie met de effecten op morfologisch niveau, kan de basisdataset, naast classificatiedoelinden, informatie verschaffen over de mate van toxiciteit en/of teratogeniteit van een chemische stof. De fysiologische eindpunten die hierbij gehanteerd worden, zijn de locomotorische activiteit van zebravislarven, geregistreerd door middel van een geautomatiseerd camerasysteem en beeldanalysesoftware en de hartslag van de embryo's. Tot slot zal geëvalueerd worden of deze integratie van morfologische en fysiologische parameters een meerwaarde biedt aan het basisclassificatiesysteem.

3 Materiaal en methoden

3.1 Huisvesting en onderhoud zebravissen

Volwassen zebravissen werden gehuisvest in een ZebTEC standalone systeem (Techniplast). Het is een semi-gesloten circulatiesysteem, waarbij het water doorheen een pre-filter (porositeit van 100 μm), een biologische filter, een mechanische filter (porositeit van 50 μm) en een koolstoffilter wordt gestuurd en langs twee UV lampen wordt geleid alvorens terug te stromen naar de verschillende zebravistanks.

De waterkwaliteit in de tanks werd gecontroleerd aan de hand van Tetratesten, waarbij de ammoniak- (NH_3), nitriet- (NO_2^-) en nitraatconcentratie (NO_3^-) gemeten werd. Elke dag werd 20% van het water automatisch gedraineerd en vervangen met vers reverse osmose water, om de accumulatie van nitraat te vermijden. Reverse osmose (RO) water is vrij van contaminanten, maar door een lage conductiviteit en zure pH is dit water niet geschikt voor de zebravistanks. Daarom werden de pH en de conductiviteit gereguleerd en constant gehouden (pH $7,5 \pm 0,2$; conductiviteit $500 \pm 25 \mu\text{S/cm}$), samen met een constante temperatuur ($28 \pm 1^\circ\text{C}$). Er werd eveneens een dag/nacht cyclus van 14 uur licht/10 uur donker angewend. Tenslotte werden de vissen twee maal per dag gevoed. 's Ochtends ontvingen de vissen ingevroren voeding, d.i. een afwisseling van muggenlarven (rood of wit), *Daphnia* of *Artemia*, en 's avonds 2% van het gemiddelde lichaamsgewicht als droogvoer (TetraMin).

3.2 Collecteren van zebravisembryo's

Eitjes werden bekomen door paring van de zebravissen, in een verhouding van 2 vrouwtjes en 1 mannetje. De zebravissen werden hiervoor overgebracht in kweekaquaria met een geperforeerde bodem om eitjes door te laten, zodat de zebravissen verhinderd werden de eitjes op te eten. De vrouwtjes werden van het mannetje gescheiden door middel van een tussenschot. Op het moment dat er de volgende morgen een lichtstimulus werd waargenomen door de vissen, werden de tussenschotjes verwijderd. Door deze lichtstimulus en door aanraking tussen de mannetjes en de vrouwtjes werden de vrouwtjes gestimuleerd tot eileg, terwijl de mannetjes gestimuleerd werden om deze eitjes te bevruchten. Na het verzamelen en spoelen van de eitjes, werden ongezonde en dode embryo's geïdentificeerd met een stereomicroscoop (Leica S8 APO) en vervolgens verwijderd. Dode embryo's konden onderscheiden worden door hun opaak uiterlijk.

3.3 Teststoffen

In een voorgaande studie (Maex, 2012), werd een uitgebreide literatuurstudie uitgevoerd, waarna vijf teratogene stoffen en 2 niet-teratogene stoffen geselecteerd werden. Hierbij werd

getracht om stoffen te selecteren met uiteenlopende teratogene werkingsmechanismen, waarvan de teratogeniteit reeds in zowel zoogdieren als in zebravissen onderzocht werd:

1. Cadmium is een genotoxisch metaal dat oxidatieve stress en inhibitie van DNA herstel kan veroorzaken (Hsu et al, 2013). Een van de meest voorkomende effecten van cadmium in de ontwikkeling van zebravisembryo's, was afwijkende axiale kromming, door defecten in de myotomen van de somieten (Hen Chow and Cheng, 2003).
2. Cafeïne is een psychoactief middel, dat bij zowel ratten als muizen cardiovasculaire malformaties blijkt te veroorzaken. In de zebravis leidt een behandeling met cafeïne tot neuromusculaire afwijkingen (Teixidó, 2012; Yeh et al, 2012; Chen et al, 2008).
3. Hydroxyurea werd reeds zeer uitgebreid bestudeerd als een model teratogeen en induceert oxidatieve en replicatieve stress in embryo's (Banh and Hales, 2013).
4. Retinoïnezuur, een referentiestof voor het valideren van ontwikkelingstoxiciteit (Selderslaghs, 2009), is een belangrijk morfogen betrokken in de patroonvorming tijdens de embryogenese, zoals het vastleggen van de voor-achter as (Shimozono, 2013).
5. Warfarine natrium, eveneens een model teratogene stof, is een anticoagulans en vitamine K antagonist (Weight et al, 2012; Van driel, 2002). Deze stof veroorzaakt teratogene en letale effecten in zebravisembryo's (Weight et al, 2012).

De niet-teratogene stoffen omvatten α -D-glucose en natriumchloride, die osmotische stress veroorzaken bij een blootstelling aan hoge concentraties.

Om de blootstellingoplossingen aan te maken, werden de stoffen opgelost in reverse osmose water met dezelfde samenstelling als het systeem van de zebravissen (conductiviteit van 500 μ S/cm, pH van 7.5 en $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Alle teststoffen werden hierin opgelost met 0.1% (v/v) DMSO. Als solventcontrole-oplossing werd een 0.1% DMSO wateroplossing gebruikt voor alle teststoffen.

3.4 Blootstellingsconcentraties

3.4.1 Voorgaande studie

In de studie van Maex (2012) werd getracht een scoringssysteem te ontwikkelen. Er werd eveneens een dataverwerkingsmethode ontwikkeld die toelaat voor elke teststof een morfologisch profiel samen te stellen. Vervolgens werd getracht een classificatiesysteem te bekomen waarbij stoffen gescheiden worden op basis van zowel hun teratogeen potentieel als de afwijkingen die ze veroorzaken.

Deze masterproef bouwt hierop verder door enerzijds de bekomen data uit deze voorgaande studie te evalueren en te gebruiken voor het berekenen van geschikte blootstellings-

concentraties om stoffen te kunnen vergelijken. Anderzijds werd het ontwikkeld scoringsstelsel geanalyseerd en verbeterd door het opstellen van een beslissingsboom. Enkele begrippen en gegevens uit de voorgaande studie worden hieronder verder toegelicht ter verduidelijking van de gebruikte methoden in deze masterproef.

a) Ontwikkeling scoringsmethode

Tijdens een Early Life Stage (ELS) test, werden de embryo's aan negen testconcentraties en twee controle-oplossingen (US EPA water en 0.1% DMSO US EPA water) blootgesteld, waarna de embryo's op 6, 24, 48, 72 en 96 hpf geëvalueerd werden op embryotoxiciteit aan de hand van 17 morfologische parameters. Vervolgens kreeg elk embryo per parameter een score toegewezen op basis van een binaire methode (0=niet afwijkend, 1=afwijkend). De gegevens die hierbij manueel werden ingegeven in Excel templates werden gebruikt in dit onderzoek voor het berekenen van blootstellingsconcentraties van de verschillende stoffen. Dit aspect wordt later (in paragraaf 3.4.2) meer in detail toegelicht.

b) LSEC-waarde

In de voorgaande studie werd het principe LSEC (Lethal and Single Effect Concentration) geïntroduceerd. De LSEC kan voor elke bestudeerde parameter berekend worden. Deze wordt gedefinieerd als de concentratie die overeenkomt met een bepaald percentage aan embryo's (50% in het geval van LSEC50), die een afwijking vertonen voor deze parameter in combinatie met het percentage aan mortaliteit. LSEC-waarden worden berekend door voor elk van de geteste concentraties het percentage van het aantal geïncubeerde embryo's op te tellen met het aantal embryo's dat een afwijking vertoont en dit voor elk morfologisch eindpunt afzonderlijk.

3.4.2 Het berekenen van blootstellingsconcentraties

In deze studie werd getracht om blootstellingsconcentraties te berekenen op basis van het LSEC principe en vanuit de beschikbare data van de voorgaande studie. Hiertoe werden concentraties berekend waarbij er verschillende effecten optreden tussen de teststoffen, dit om een classificatie mogelijk te maken. Hierdoor kan een ELS test uitgevoerd worden met slechts enkele concentraties per stof. De werkwijze waarop deze waarden berekend werden, zullen hier kort toegelicht worden.

Allereerst werd steeds de totale mortaliteit van alle embryo's per stof en per concentratie in rekening gebracht. Indien deze mortaliteitsparameter buiten beschouwing gelaten werd, werd er geen 100% effect bekomen bij de hoogste testconcentratie, waardoor er nadien geen dosis-respons curve opgesteld kon worden. Om de percentages van embryo's met een afwijking te

berekenen per morfologische parameter werd gebruik gemaakt van de binaire (0=niet afwijkend, 1=afwijkend) methode. Vervolgens werd op de bekomen data een Abbott's correctie toegepast (Abbott, 1925). Hierbij werd het percentage geaffecteerde embryo's gecorrigeerd voor het optreden van mortaliteit en/of afwijkingen in de controle-embryo's. De Abbott's correctie wordt als volgt geformuleerd:

$$\text{Gecorrigeerd \%} = \frac{(P - P_0)}{100 - P_0} \times 100$$

P is hierbij het percentage geaffecteerde embryo's, dat werd blootgesteld aan een bepaalde concentratie en P_0 stelt het percentage geaffecteerde controle embryo's voor bij diezelfde test. Om vervolgens een sigmoïdale dosis-respons curve per stof te bekomen, werden de bekomen percentages uitgezet ten opzichte van de overeenkomstige logaritmisches getransformeerde concentraties. Deze bewerkingen werden uitgevoerd in Graphpad Prism 5. De basis van de dosis-respons curve werd hierbij vastgezet op 0% en de top op 100%.

Voor elke parameter van elke te testen stof werden vervolgens de testconcentraties berekend, aan de hand van de dosis-respons curves, d.i. de LSEC25, LSEC50 en LSEC75 die respectievelijk overeenkomen met 25%, 50% en 75% van de embryo's die een specifieke afwijking vertonen, gecombineerd met de mortaliteit.

Op die manier kan een onderscheid gemaakt worden tussen de verschillende concentraties waarop bepaalde morfologische eindpunten zich manifesteren. Vervolgens werd per stof de LSEC waarde (zowel 25, 50 als 75) gekozen voor het effect dat bij de laagste concentratie het eerst naar voren komt. Hiertoe werd verondersteld de teratogene stoffen te kunnen onderscheiden van de niet-teratogene stoffen, doordat er verwacht wordt weinig morfologische afwijkingen te bekomen bij niet-teratogene stoffen, en een laag percentage mortaliteit en veel afwijkingen voor teratogene stoffen.

Voor de verdere morfologische scoring in de experimentele fase van deze studie, werden deze berekende LSEC25, -50 en -75-waardes gebruikt als testconcentraties (Tabel 1).

Tabel 1: Blootstellingsconcentraties per teststof. De LSEC25, -50 en -75, d.i. Lethal and Single Effect Concentration, komen overeen met de concentraties waarbij 25%, 50% en 75% van de zebravisembryo's respectievelijk een specifieke afwijking vertonen of waarbij deze concentraties leiden tot mortaliteit.

Stof	LSEC25	LSEC50	LSEC75
Cadmium chloride hydraat (μM)	0.7157	13.9	86.36
Cafeïne (μM)	289.2	403.3	563
Alfa-D-Glucose (mM)	245	267.2	291.5
Hydroxyurea (mM)	2.276	4.369	6.867
Natriumchloride (mM)	27.34	41.61	63.33
Retinoïnezuur (nM)	1.157	1.869	3.019
Warfarine natrium (μM)	376.5	479.3	610.3

3.5 Blootstelling van de embryo's

Na het collecteren van de embryo's werden deze binnen 0.5 tot 1 uur na bevruchting blootgesteld aan de testconcentraties. De gewassen embryo's werden gelijk verdeeld in plasticen potten, die reeds de te testen stoffen bevatten, aan de hand van een steriel zeefje. Hierdoor werden alle embryo's op hetzelfde moment blootgesteld. Vervolgens werden 48-wellplaten gevuld met de te testen oplossingen en de controle-oplossing (1 ml/well).

Nadien werden de embryo's verdeeld in de multiwell platen (1 embryo/well), die gecontroleerd werden om onbevruchte eitjes te vermijden. De bevruchte eitjes konden onderscheiden worden van de onbevruchte door een duidelijke scheiding van dooierrijk en dooierrij cytoplasma, alsook door middel van de eerste celdelingen.

Vervolgens werden de multiwell platen afgesloten met parafilm om verdamping te voorkomen en bewaard in een incubator (dag/nacht cyclus van 14/10 h; 28,5°C).

Om de 48 uur werden de testoplossingen vervangen vanwege mogelijke degradatie en om accumulatie van afvalstoffen te verhinderen.

De teststoffen met een hoge instabiliteit in een waterige omgeving, hoge lichtgevoeligheid, korte halfwaardetijd of hoge bindingscapaciteit aan de wanden van de wellplaten, werden dagelijks ververs (Retinoïnezuur, Warfarine natrium, Hydroxyurea en Cadmium).

3.6 Opstellen protocol voor het scoren van zebrafisembryo's

Voor het opstellen van een gestandaardiseerde handleiding (www.zebrafishlab.be/scoring) voor het scoren van de specifieke eindpunten bij blootgestelde embryo's, werden preliminaire testen uitgevoerd met de teratogene teststoffen cafeïne en retinoïnezuur. Deze stoffen zijn immers gekend om verschillende afwijkingen te induceren bij zebrafisembryo's.

Eerst werden niet blootgestelde embryo's bekeken en gefotografeerd om de normale ontwikkeling van het zebrafisembryo te kunnen beschrijven. Vervolgens werden de blootgestelde embryo's bestudeerd onder een stereomicroscop. Er werden steeds vergelijkingen gemaakt tussen blootgestelde en controle embryo's om een afwijking te kunnen vaststellen, alsook gebruik makend van de morfologische beschrijvingen van Kimmel et al. (1995). Morfologische afwijkingen werden gefotografeerd om nadien een consensus te bekomen over welke eindpunten meegenomen werden voor een morfologische scoring.

De lijst van mogelijke afwijkingen werd bijgevolg opgesteld aan de hand van eigen bevindingen, door een blootstelling aan cafeïne en retinoïnezuur. Bijkomende afwijkingen werden toegevoegd op basis van de literatuur.

Vervolgens werd een beslissingsboom opgesteld om duidelijkheid te creëren in de talloze afwijkingen en om standaardisatie van scoring te kunnen bekomen. Deze boom werd gecreëerd in het programma Visio van Microsoft.

De handleiding start met een eerste fase, waarbij de levensvatbaarheid van de larven geëvalueerd wordt. Hierbij wordt in een eerste stap de letaliteit van het embryo, gedefinieerd als coagulatie, geobserveerd.

Vervolgens worden de vragen gesteld of het hoofd, het abdomen en de staart van elkaar te onderscheiden zijn, alsook of de afwijkingen van één of meerdere lichaamsonderdelen zo groot zijn dat één of meerdere delen niet meer herkenbaar zijn. Er kan immers geen grondige evaluatie van de verschillende onderdelen van het embryo tot stand komen indien de verschillende lichaamsonderdelen niet te onderscheiden zijn.

Tenslotte moet de ontluiking van de embryo's onderzocht worden. Indien nog geen ontluiking werd bekomen vanaf een tijdstip van 72 hpf, moeten de chorions manueel verwijderd worden vooraleer de verdere afwijkingen geobserveerd kunnen worden. Deze stap is cruciaal om de verschillende mogelijke afwijkingen duidelijk te kunnen bestuderen.

In een tweede deel van deze beslissingsboom worden de afzonderlijke afwijkingen onderzocht (Tabel 2). Hierbij wordt er gebruik gemaakt van twee verschillende systemen die aangeven hoe de scoring gerealiseerd moet worden, d.i. een additief (+) en mutueel exclusief systeem (=). Elk morfologisch eindpunt wordt toegekend aan één van deze systemen. Bij een additief systeem kunnen de verschillende onderverdelingen van een afwijking met elkaar opgeteld worden, dus m.a.w. kunnen deze onderverdelingen als aparte afwijkingen beschouwd worden. Zo zal bijvoorbeeld een knik in de staart een score van 1 toegewezen krijgen, net zoals een wefelselafwijking en curve in de staart. Deze scores kunnen met elkaar opgeteld worden om een totale score van 3 te bekomen voor de categorie, afwijking van de staart. Bij een mutueel exclusief systeem daarentegen worden de subdivisies van afwijkingen aan een embryonaal deel gelijk gesteld aan elkaar. Hierbij zal er een enkele score worden toegewezen aan het embryo voor dit eindpunt indien er minstens één van de onderverdelingen van de afwijking zich voordoet. Tot dit systeem behoren enkel de parameters malformatie dooier en afwijkende pigmentatie. Zo zal bijvoorbeeld een afwijking aan de dooier zelf, of een afwijking aan de dooier verlenging, of een combinatie van beide, leiden tot een score van 1 voor een malformatie van de dooier.

In de beslissingsboom wordt eveneens aangegeven welke morfologische eindpunten behoren tot het additief/mutueel exclusief systeem, waardoor er geen verwarring mogelijk is.

Bovendien worden er bij elke afwijking de mogelijke scenario's weergegeven. Deze scheppen duidelijkheid in de mogelijke combinaties van de verschillende soorten subdivisies binnen een bepaalde afwijking. Tot slot kan er steeds een vergelijking gemaakt worden met een referentielarve.

Tabel 2: Morfologische eindpunten gebruikt in de huidige studie, met bijbehorende morfologische onderverdelingen en gebruikt scoringsysteem.

Morfologische afwijkingen	Morfologische subdivisie	Bijbehorend scoringsysteem
Afwijking staart	Knik staart	Additief systeem
	Curve staart	
	Weefselafwijking staart	
Oedemen	Oedeem hoofd	Additief systeem
	Oedeem pericard	
	Oedeem yolk	
	Oedeem niet herkenbaar	
Bloedophoping	Bloedophoping staart	Additief systeem
	Bloedophoping hoofd	
	Bloedophoping hart	
	Bloedophoping yolk	
	Bloedophoping yolk extension	
Malformatie pectorale vin	Ontbreken vin links	Additief systeem
	Ontbreken vin rechts	
	Kromming vin links	
	Kromming vin rechts	
Malformatie yolk	Malformatie yolk	Mutueel exclusief systeem
	Malformatie yolk extension	
Afwijkingen in het cardiovasculair weefsel	Malformatie hart	Additief systeem
	Geen bloedcirculatie in staart	
	Verstoord bloedcirculatie in staart	
	Hart klopt niet	
Malformatie hoofd	Afwijking vorm hoofd	Additief systeem
	Afwijking oor	
	Afwijking mond	
	Afwijking oog	
Afwijkende pigmentatie	Donkerdere pigmentatie	Mutueel exclusief systeem
	Lichtere pigmentatie	
Non-detachment tail	Non-detachment tail	
Niet opgeblazen zwemblaas	Niet opgeblazen zwemblaas	

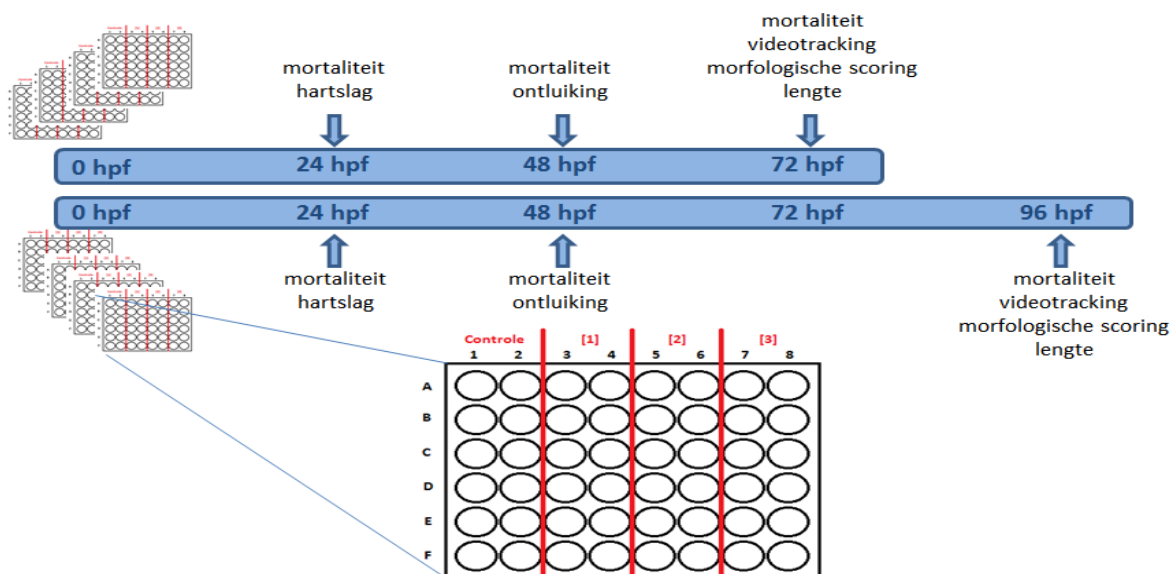
3.7 Experimentele set-up

Tijdens dit onderzoek werd nagegaan welke morfologische afwijkingen in de ontwikkeling van een zebrafisembryo kunnen waargenomen worden na het bloostellen aan verschillende teststoffen. Per stof werd er gebruik gemaakt van 3 verschillende concentraties, d.i. LSEC25, LSEC50 en LSEC75, die steeds vergeleken werden met een controleconditie.

De Early Life Stage (ELS) testen werden uitgevoerd per stof, met steeds 4 replicaten. Er werden per tijdstip en per concentratie 48 zebraisembryo's verzameld, d.i. 12 zebraisembryo's per replicaat per concentratie per tijdstip. Er werd vervolgens gewerkt met vier 48-wellplaten per te testen tijdstip, waarbij elke plaat beschouwd kan worden als een volledig replicaat van de 4 verschillende concentraties. Dit design werd gekozen zodat eventuele verschillen tussen platen geëlimineerd kunnen worden (Figuur 2). Op 24 hpf werden de mortaliteit en hartslag van de embryo's gemeten. Op 48 hpf werd naast de mortaliteit, eveneens de ontluiking geregistreerd. Op 72 en 96 hpf, werden allereerst fysiologische parameters opgevolgd aan de hand van videotracking.

Vervolgens werden de embryo's verdoofd in MS-222 (ethyl-3-aminobenzoaat methaansulfonaat; 50 mg/l) om een efficiënte morfologische evaluatie te kunnen uitvoeren. Na de fysiologische en morfologische evaluatie, werd eveneens de lengte van de embryo's gemeten. Nadat alle parameters gescoord werden, werden de larven in vloeibaar stikstof geplaatst om vervolgens te bewaren op -80°C voor eventueel gebruik in een vervolgstudie.

Een overzicht van de experimentele set-up kan teruggevonden worden in figuur 2.



Figuur 2: Experimentele set-up voor de scoring van de embryo's. Onderaan wordt het design van de platen, gebruikt tijdens de ELS testen, weergegeven. Hierbij worden de 4 verschillende condities in dezelfde plaat opgenomen om de verschillen die kunnen optreden tussen de verschillende platen en het meten op een verschillend tijdstip te kunnen elimineren. In totaal werden er per stof 4 48-weelplaten gebruikt per tijdstip.

3.8 Evaluatie van de embryo's

3.8.1 Fysiologisch aspect

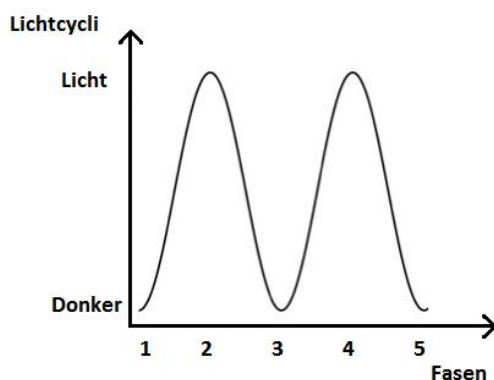
De hartslag van de overlevende embryo's werd op 24 hpf gemeten door deze te tellen gedurende 20 seconden. De locomotorische activiteit van de zebraislarven werd onderzocht aan de hand van een videotrackingsysteem van Viewpoint Lifesciences (Zebrabox, Frankrijk).

De beweging van de zebravislarven werd hierbij geregistreerd door middel van een geautomatiseerd camerasysteem, waarna er met behulp van beeldanalysesoftware specifieke eindpunten werden bepaald. Hiertoe behoren het aantal bewegingen (counts), de duur van de bewegingen (duration) en de duur per beweging (duration per count). Deze eindpunten worden toegeschreven aan de categorie “activiteit”. Bijkomende eindpunten worden geregistreerd in de categorie “zwemcapaciteit”, waartoe de afgelegde afstand, zwemsnelheid, aantal wijzerzin en tegenwijzerzin draaibewegingen en genomen hoeken behoren.

De parameters die ingesteld werden in de software van het videotrackingsysteem, werden geoptimaliseerd in een voorgaande studie (Cop, 2013). De leeftijd van de zebravislarven, het tijdstip van meten, de acclimatisatieperiode, de duur van het protocol, de invloed van het licht en de well-grootte behoren tot deze geoptimaliseerde parameters.

In het gebruikt protocol werd de locomotorische activiteit van de zebravislarven onderzocht op 72 hpf en 96 hpf. De experimenten werden ongeveer 4 uur na de ochtend lichtstimulus gestart, omdat uit literatuur bleek dat de zebravislarven vanaf dit moment een stabiele activiteit vertonen. Bijkomend werd een acclimatisatieperiode van 10 en 25 minuten ingevoerd voor 72 en 96 hpf oude zebravislarven respectievelijk. De larven vertonen immers een hogere activiteit na het verplaatsen van de incubator naar de Zebrabox vanwege stress.

In het algemeen vertonen zebravislarven een lagere activiteit in licht dan in donker, maar de lichtperiode blijkt de activiteit in de daaropvolgende donkere periode te stimuleren. Het gekozen protocol bestaat bijgevolg uit vijf verschillende fasen (Figuur 3) om na te gaan welke veranderingen plaatsvinden in verband met de reactie op licht en donker.



Figuur 3: Overzicht van de verschillende lichtcycli in de vijf fasen van het geoptimaliseerd protocol om locomotorische activiteit te bestuderen.

Hiertoe werd gestart met een donkerperiode om een basisactiviteit te kunnen vaststellen, waarmee de volgende fasen vergeleken kunnen worden. Vervolgens werden afwisselend een licht- en donkerperiode geïnduceerd van 10 minuten. De effecten van licht en donker vinden

immers reeds plaats gedurende de eerste 10 minuten van een fase. Bijgevolg duurt het protocol in totaal 50 minuten. Tijdens de lichtperiode bleek de activiteit te dalen tot onder de basisactiviteit van de eerste donkerperiode. In de donkerperiodes die na een lichtperiode voorkomen steeg de activiteit tot boven deze basisactiviteit.

Om meerdere larven op eenzelfde moment te kunnen meten werd gekozen om 48-well platen te gebruiken. Deze parameter geeft informatie weer in verband met de linker en rechter oogontwikkeling en was daarom belangrijk om op te nemen in het protocol. Een overzicht van het geoptimaliseerd protocol kan teruggevonden worden in tabel 3.

Tabel 3: Overzicht van de geoptimaliseerde parameters (Cop, 2013).

Variabelen	Parameter in geoptimaliseerd protocol
Leeftijd van zebrawislarven	72 en 96 hpf
Tijdstip van meten	4 uur na lichtstimulus
Acclimatisatieperiode	10 minuten (72 hpf)
	25 minuten (96 hpf)
Duur van het protocol	10 minuten per fase
Aantal fasen	5 fasen (3x donker, 2x licht)
Well-grootte	48-well platen

3.8.2 Morfologisch aspect

De specifieke eindpunten die gebruikt werden tijdens de scoring van de verschillende morfologische afwijkingen worden weergegeven in tabel 4. De mogelijke afwijkingen die optreden ten gevolge van de blootstellingen werden geëvalueerd, met behulp van een stereomicroscoop (vergroting: 12.5X – 80X) aan de hand van de beslissingsboom, op 72 en 96 uur na bevruchting. Bijkomend werd de mortaliteit en ontluiking eveneens elke 24 uur gescoord. Ook de lengte van de overlevende larven werd per conditie gefotografeerd op 72 en 96 hpf. De larven werden hiervoor overgebracht naar een draagglaasje, waarop op voorhand een krasje met gekende lengte werd aangebracht als calibrator. Vervolgens werd de lengte van de larven gemeten aan de hand van het softwareprogramma ImageJ (Wayne Rasband).

Tabel 4: De specifieke eindpunten die gehanteerd werden tijdens de morfologische scoring. Hierbij worden de verschillende afwijkingen die waargenomen kunnen worden aangegeven, samen met eigen interpretatie van de onderverdeling (letaal, subletaal en teratogeen) op basis van de beschikbare literatuur in verband met ELS testen tot 2013.

Parameter	Onderverdeling volgens de literatuur	Aantal uren na bevruchting (hpf)			
		24	48	72	96
Coagulatie	Letaal	*	*	*	*
Geen onderscheid lichaamsdelen				*	*
Onherkenbaarheid lichaamsdelen				*	*
Geen ontluiking	Subletaal		*	*	*
Knik staart	Teratogeen			*	*
Curve staart	Teratogeen			*	*
Weefselafwijking staart				*	*
Oedeem hoofd	Subletaal			*	*
Oedeem pericard	Subletaal			*	*
Oedeem yolk	Subletaal			*	*
Oedeem niet herkenbaar	Subletaal			*	*
Bloedophoping staart				*	*
Bloedophoping hoofd				*	*
Bloedophoping hart				*	*
Bloedophoping yolk				*	*
Bloedophoping yolk extension				*	*
Ontbreken vin links				*	*
Ontbreken vin rechts				*	*
Kromming vin links				*	*
Kromming vin rechts				*	*
Malformatie yolk of yolk extension	Teratogeen			*	*
Malformatie hart	Teratogeen			*	*
Geen bloedcirculatie in staart	Teratogeen			*	*
Verstoord bloedcirculatie in staart	Teratogeen			*	*
Hart klopt niet	Letaal			*	*
Afwijking vorm hoofd	Teratogeen			*	*
Afwijking oor	Teratogeen			*	*
Afwijking mond				*	*
Afwijking oog	Teratogeen			*	*
Donkerdere of lichtere pigmentatie	Subletaal			*	*
Non-detachment tail	Letaal			*	*
Niet opgeblazen zwemblaas					*

3.9 Data-analyse

3.9.1 Verwerking van de morfologische data

Zoals reeds eerder vermeld, werd er een morfologische scoring uitgevoerd van de zebravislarven op 72 en 96 hpf. De bekomen binaire data werd statistisch geanalyseerd aan de hand van een Chi-kwadraat test. Vervolgens werden de statistisch significante afwijkingen per stof weergegeven in een taartdiagram.

Nadien werd er gezocht naar een manier om de data te kunnen clusteren. Er werd gekozen om de categorische data die bekomen werden vanuit de morfologische scoring om te zetten in percentages van de verschillende afwijkingen om continue waarden te verkrijgen die gebruikt kunnen worden in de clusteranalyses. De percentages van alle specifieke eindpunten werden berekend per stof, per concentratie en per replicaat.

3.9.2 Lengte en fysiologische dataverwerking

De data in verband met de locomotorische activiteit, lengte en hartslag van de overlevende zebrawislarven werden bekomen als continue waardes en werden statistisch geanalyseerd door middel van een OneWay ANOVA analyse met een Bonferonni multiple testing correctie. Hierbij werd eerst gecontroleerd of de lengte- en hartslag parameters normaal verdeeld waren per concentratie per stof aan de hand van een Kolmogorov-Smirnov test (met Dallal-Wilkinson-Lillie voor P-waarde) en een Shapiro-Wilk normaliteitstest.

Om deze dataset te kunnen vergelijken en combineren met deze van de morfologische scoring in een clusteranalyse, werden de fysiologische data eveneens omgezet in percentages door de controle conditie gelijk te stellen aan 100%. Hierdoor werd een percentage bekomen die de gelijkens weergeeft van de gebruikte stof met de controle van deze stof. Indien er een stijging werd waargenomen voor een specifieke fysiologische parameter, kreeg deze als gevolg een percentage van groter dan 100% en omgekeerd.

Aangezien voor de morfologische data de controle als 0% beschouwd werd, waarbij een specifieke afwijking leidt tot een verhoging van dit percentage, werden de bekomen percentages van de fysiologische data verminderd met 100. Zo kregen de parameters, waarbij een verhoging of een verlaging werd geobserveerd ten opzichte van een controle respectievelijk een positief of negatief percentage toegewezen.

Tot slot werd de Pearson correlatie coëfficiënt gebruikt om de correlatie tussen de lengte en de hartslag parameters te bepalen (p-waarde <0.05).

3.9.3 Clusteringanalyse van de morfologische en fysiologische data

Van de bekomen morfologische en fysiologische gegevens werd vervolgens een datamatrix opgesteld, waarbij de percentages van de verschillende specifieke eindpunten werden weergegeven voor alle verschillende stoffen, per conditie en per replicaat.

Vervolgens werd een clusteranalyse uitgevoerd om enerzijds te controleren of de replicaten van de verschillende stoffen samen clusteren, en anderzijds om na te gaan of de verschillende

teststoffen van elkaar gescheiden worden. Hierbij werd getracht een scheiding van teratogene en niet-teratogene stoffen te verwezenlijken op basis van hun specifieke eindpunten.

Een eerste clusteranalyse werd enkel uitgevoerd op de morfologische data, waarna een integratie van de morfologische en de fysiologische datasets gerealiseerd werd om na te gaan of deze benadering de teratogene stoffen op een meer accurate en gevoelige wijze kan classificeren. Hierbij werd de euclidische afstand als afstandsmaat gebruikt, d.i. een meetkundige afstand die de afstand tussen twee objecten in een ruimte reflecteert, om de directe afstand tussen de verschillende stoffen te kunnen representeren. De gebruikte average-linkage als agglomeratiemethode, d.i. een methode om de dichtstbijzijnde clusters samen te nemen, definieert afstanden tussen groepen als het gemiddelde van de afstanden tussen alle paren van individuen in de afzonderlijke clusters.

Voor het opstellen van de hiërarchische clusteringen werd gebruik gemaakt van Multi Experiment Viewer (MeV). Deze toepassing werd ontwikkeld voor de analyse en visualisatie van o.a. microarray data, maar werd in deze studie aangewend om een visualisatie van de clusteringen van de morfologische en fysiologische data weer te geven in de vorm van heatmaps.

Tot slot werd een ‘Significance Analysis of Microarrays’ of SAM analyse uitgevoerd. Deze analyse methode werd ontwikkeld voor het analyseren van microarray data, maar kan ook op andere datatypes toegepast worden. In de huidige studie werd aan de hand van deze analyse nagegaan of er parameters bepaald kunnen worden die significant sterker bijdragen om de verschillende teststoffen van elkaar te scheiden in de verschillende clusters. Hierbij werd gekozen voor een False Discovery rate van 0%, zodat er geen vals positieve resultaten geobserveerd kunnen worden. Aan de hand van deze methode werd eveneens nagegaan of bepaalde afwijkingen significant sterker tot expressie kwamen bij de teratogene stoffen ten opzichte van de niet-teratogene stoffen.

4 Resultaten

4.1 Morfologische beslissingsboom

De beslissingsboom kan teruggevonden worden op de volgende link: www.zebrafishlab.be/scoring. Na het openen van de link, wordt een startmenu weergegeven. Hierbij kan een keuze gemaakt worden tussen het bekijken van de ontwikkelingsstadia van een zebrafisembryo tot 5 hpf, of het bezichtigen van de beslissingsboom voor het scoren van embryo's op 72 en 96 hpf.

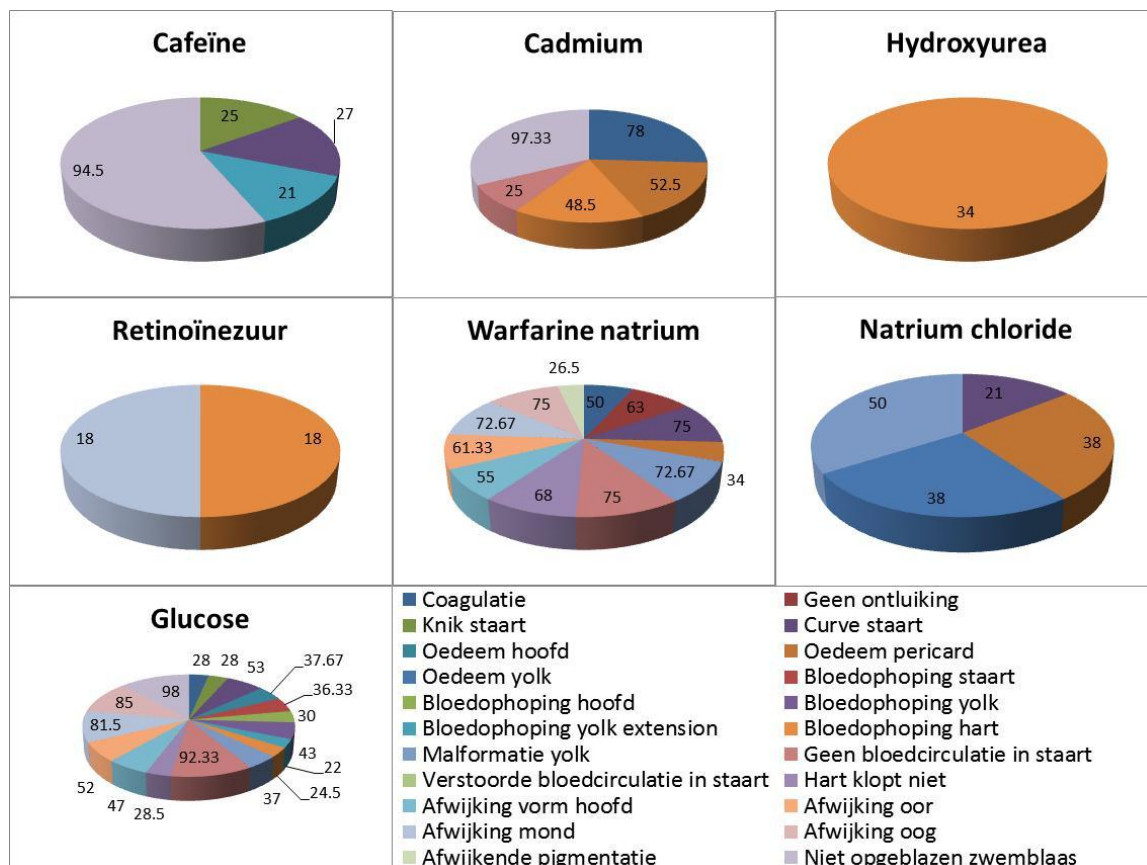
Deze beslissingsboom is een interactief systeem, waarbij er per vraag/afwijking meer informatie en bijbehorende foto's, bekomen kunnen worden door hierop te klikken. Bijkomend kan er steeds een vergelijking gemaakt worden met een referentielarve.

4.2 Morfologische evaluatie

4.2.1 Morfologische eindpunten in de beslissingsboom

Uit de statistisch geëvalueerde resultaten van de morfologische scoring (tabellen niet getoond) werden de verschillende significant aanwezige afwijkingen gehaald en per stof in een taartdiagram weergegeven (Figuur 4).

Hiervoor werden gemiddelde percentages, over de verschillende concentraties berekend voor het tijdstip 96 hpf. Aan de hand van de statistische analyse werden immers meer significante afwijkingen waargenomen op 96 hpf ten opzichte van 72 hpf. Uit deze taartdiagrammen blijkt dat er verschillende patronen van afwijkingen teruggevonden kunnen worden per stof. Een visualisatie van de verschillende afwijkingen kan teruggevonden worden in de beslissingsboom (www.zebrafishlab.be/scoring).



Figuur 4: Taartdiagrammen met de significante eindpunten per stof op 96 hpf. De resultaten werden statistisch geanalyseerd aan de hand van een Chi kwadraat test. De legende wordt rechtsonder in de figuur weergegeven. De parameters worden uitgedrukt in gemiddeld percentage over de verschillende concentraties heen. Het percentage dat waargenomen werd, wordt aangeduid in de taartdiagram. De legende wordt rechtsonder in de figuur gerepresenteerd.

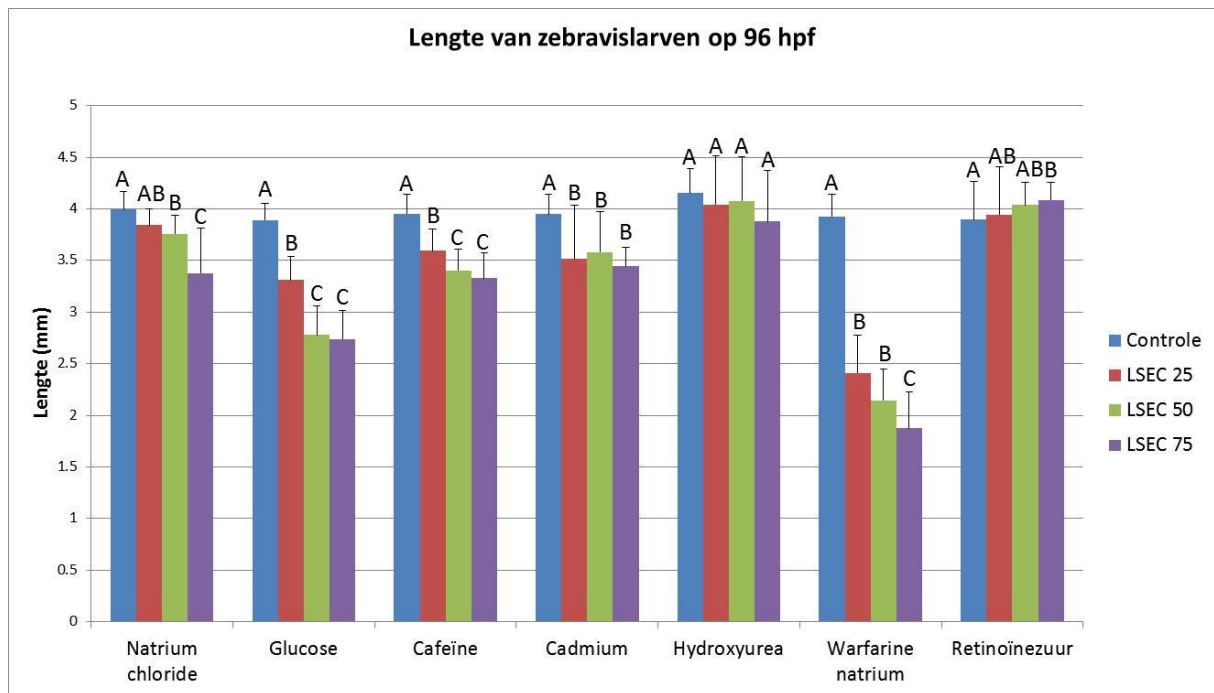
Een blootstelling aan cafeïne leidde tot een knik en een curve in de staart en bloedophopingen in de dooierverlenging. Hierbij werd eveneens een hoog percentage aan zebravislarven waargenomen waarbij de zwemblaas nog niet was opgeblazen op 96 hpf.

Een blootstelling aan cadmium daarentegen leidde in eerste instantie tot een hoog percentage aan mortaliteit. Bijkomend werden oedemen van het pericard teruggevonden, samen met bloedophopingen in het hart en een ontbrekende bloedcirculatie in de staart. Ook hier werd een significant percentage aan larven geobserveerd waarbij de zwemblaas nog niet was opgeblazen op 96 hpf. Een blootstelling aan hydroxyurea induceerde enkel bloedophopingen in het hart. Retinoïnezuur leidde tot bloedophopingen aan het hart en afwijkingen aan de mond. Tot slot induceerde warfarine natrium afwijkingen in nagenoeg alle parameters. Bovenop een zeer hoog mortaliteitspercentage, werd een vertraagde ontluiking vastgesteld.

Hoewel glucose beschouwd wordt als een niet-teratogene stof, werden hier eveneens een groot aantal afwijkingen teruggevonden in nagenoeg alle onderzochte eindpunten. Ook hier werd een groot percentage aan larven geobserveerd waarvan de zwemblaas nog niet werd opgeblazen op 96 hpf. Tot slot induceerde een blootstelling aan natriumchloride, een tweede niet-teratogene stof, oedemen aan het pericard en de dooier, maar ook het krommen van de staart en malformaties van de dooier.

4.2.2 Lengte

De lengte van zebravislarven werd gemeten op 72 en 96 hpf, voor elke concentratie per stof. Door de gelijkende patronen in lengte die werden waargenomen voor de afzonderlijke tijdstippen, worden enkel de resultaten op 96 hpf gerepresenteerd (Figuur 5).



Figuur 5: Gemiddelde lengte van zebravislarven gemeten op 96 hpf. Deze meting werd uitgevoerd voor alle geteste stoffen, per concentratie. Op de x-as worden de verschillende stoffen teruggevonden en op de y-as wordt de gemiddelde lengte in mm over de verschillende replicaten weergegeven. Foutbalken geven de standaard deviatie weer. De vier geteste concentraties kunnen vergeleken worden per stof, waarbij een verschil in letter (A, B, C, D) wijst op een significant effect binnen één geteste stof. De statistische significantie werd aangetoond aan de hand van een OneWay ANOVA.

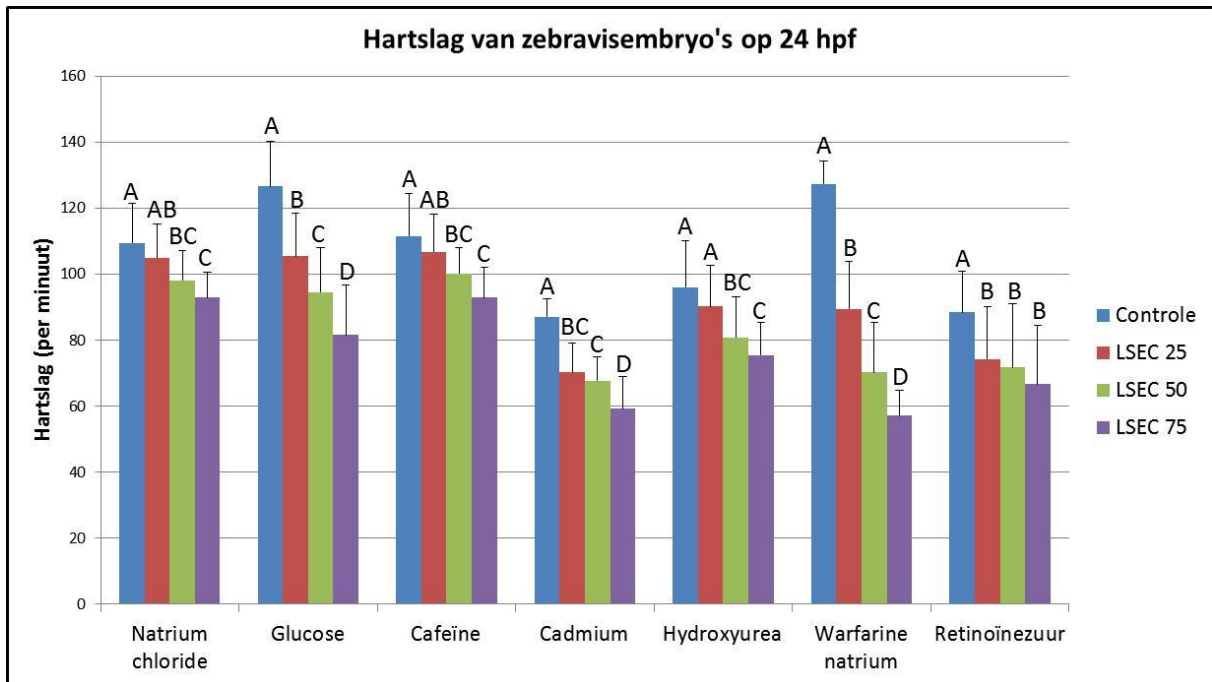
Hydroxyurea en retinoïnezuur blijken nagenoeg geen invloed te hebben op de lengte van zebravislarven, in tegenstelling tot de stoffen glucose, cafeïne, cadmium en warfarine natrium die een significante daling in lengte induceren ten opzichte van de controle.

Voor glucose en cafeïne kan er eveneens een significante daling waargenomen worden in lengte bij de LSEC50 en -75 concentratie ten opzichte van de LSEC25 concentratie. Voor warfarine natrium is er een significante daling bij de hoogste concentratie (LSEC75) ten opzichte van elke geteste concentratie. Tenslotte blijkt een blootstelling aan natriumchloride een significante daling te induceren in lengte ten opzichte van de controle, indien een blootstelling gerealiseerd werd met hogere concentraties. Bovendien vertoont een blootstelling aan de hoogste concentratie een significante daling ten opzichte van de overige geteste concentraties.

4.3 Fysiologische evaluatie

4.3.1 Hartslag

De hartslag van de overlevende zebravisembryo's werd gemeten voor elke conditie per stof. De resultaten worden weergegeven in figuur 6.



Figuur 6: Gemiddelde hartslag van zebravisembryo's gemeten op 24 hpf. Deze meting werd uitgevoerd voor alle geteste stoffen, per concentratie. Op de x-as worden de verschillende stoffen teruggevonden en op de y-as wordt de gemiddelde hartslag per minuut over de verschillende replicaten weergegeven. Foutbalken geven de standaard deviatie weer. De vier geteste concentraties kunnen vergeleken worden per stof, waarbij een verschil in letter (A, B, C, D) wijst op een significant effect binnen één geteste stof. De statistische significantie werd aangetoond aan de hand van een OneWay ANOVA.

Uit deze grafiek blijkt een daling in hartslag voor al de geteste stoffen apparent. Hierbij werd een significante daling waargenomen bij alle concentraties ten opzichte van de controle voor de stoffen glucose, cadmium, warfarine natrium en retinoïnezuur. Bijkomend wordt een significante daling in hartslag waargenomen voor de stoffen glucose en warfarine ten opzichte van elke concentratie, waardoor een duidelijke dosis-respons geobserveerd wordt.

Voor de stoffen natriumchloride, cafeïne en hydroxyurea werd een significante daling geregistreerd voor de LSEC50 en LSEC75 concentraties ten opzichte van de controle, waarbij de LSEC75 nog eens significant verschilt van de LSEC25.

4.3.2 Zwemcapaciteit

Na een blootstelling van zebravislarven aan de verschillende teststoffen, werden deze geëvalueerd naargelang de activiteit en zwemcapaciteit die ze vertoonden op 72 en 96 hpf.

De significante effecten ten opzichte van de controle worden weergegeven in tabel 5 (96 hpf).

Table 5: Fysiologische afwijkingen per conditie, per stof voor het tijdstip 96 hpf. Enkel de statistisch significante parameters worden aangetoond met een pijltje, waarbij deze condities leidt tot een significante daling of stijging ten opzichte van de controle. Deze statistische significantie werd aangetoond aan de hand van een OneWay ANOVA.

96 hpf Parameters	Natrium chloride			Glucose			Cafeïne			Cadmium			Hydroxyurea			Warfarine natrium			Retinoïnezuur			
	LSEC25	LSEC50	LSEC75	LSEC25	LSEC50	LSEC75	LSEC25	LSEC50	LSEC75	LSEC25	LSEC50	LSEC75	LSEC25	LSEC50	LSEC75	LSEC25	LSEC50	LSEC75	LSEC25	LSEC50	LSEC75	
Fase 1: Count			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 2: Count			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 3: Count			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 4: Count			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 5: Count			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 1: Duur			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 2: Duur			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 3: Duur			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 4: Duur			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 5: Duur			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 1: Duur per count																						
Fase 2: Duur per count																						
Fase 3: Duur per count																						
Fase 4: Duur per count																						
Fase 5: Duur per count																						
Fase 1: Afstand			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 2: Afstand			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 3: Afstand			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 4: Afstand			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 5: Afstand			↓			↓			↓			↓						↓				↓
Fase 1: Zwemsnelheid																						
Fase 2: Zwemsnelheid																						
Fase 3: Zwemsnelheid																						
Fase 4: Zwemsnelheid																						
Fase 5: Zwemsnelheid																						
Fase 1: CW Draalbewegingen																						
Fase 2: CW Draalbewegingen																						
Fase 3: CW Draalbewegingen																						
Fase 4: CW Draalbewegingen			↑			↑			↑			↑						↑				↑
Fase 5: CW Draalbewegingen																						
Fase 1: CCW Draalbewegingen																						
Fase 2: CCW Draalbewegingen																						
Fase 3: CCW Draalbewegingen																						
Fase 4: CCW Draalbewegingen																						
Fase 5: CCW Draalbewegingen																						
Fase 1: Hoeken			↑			↑			↑			↑						↑				↑
Fase 2: Hoeken																						
Fase 3: Hoeken																						
Fase 4: Hoeken			↑			↑			↑			↑						↑				↑
Fase 5: Hoeken																						

Hieruit blijkt dat, net zoals bij de morfologische scoring, meer significante effecten werden waargenomen op 96 hpf ten opzichte van 72 hpf. Indien een vergelijking gemaakt wordt tussen de verschillende stoffen, wordt opgemerkt dat warfarine natrium, glucose, cafeïne en

cadmium, in deze welbepaalde volgorde, de meeste significante effecten induceren. Dit in tegenstelling tot natriumchloride, dat een middelmatig aantal effecten induceert, en hydroxyurea en retinoïnezuur, waarbij nagenoeg geen effecten werden geobserveerd.

Hierbij zijn volgende parameters zeer onderhevig aan de blootstelling van chemicaliën: het aantal bewegingen (count), de duur van de bewegingen, de afgelegde afstand en de gebruikte hoeken. De draaibewegingen en de zwemsnelheid worden echter in mindere mate beïnvloed en veranderingen in de duur per beweging blijkt door geen enkele stof geïnduceerd te worden.

4.4 Clusteranalyse van de morfologische en fysiologische profielen

4.4.1 Clusteranalyse van de morfologische data

Om een classificatie van de verschillende teststoffen, alsook een onderscheiding tussen teratogene en niet-teratogene stoffen mogelijk te maken, werd een clusteranalyse aan de hand van de morfologische data uitgevoerd. Vervolgens werd er per tijdstip geanalyseerd in welke mate de verschillende replicaten, d.i. herhalingen van eenzelfde experiment, en concentraties van de geteste stoffen samen clusteren. Nadien werd gecontroleerd hoe de teratogene en niet-teratogene stoffen zich ten opzichte van elkaar verhouden in de verschillende gevormde groepen.

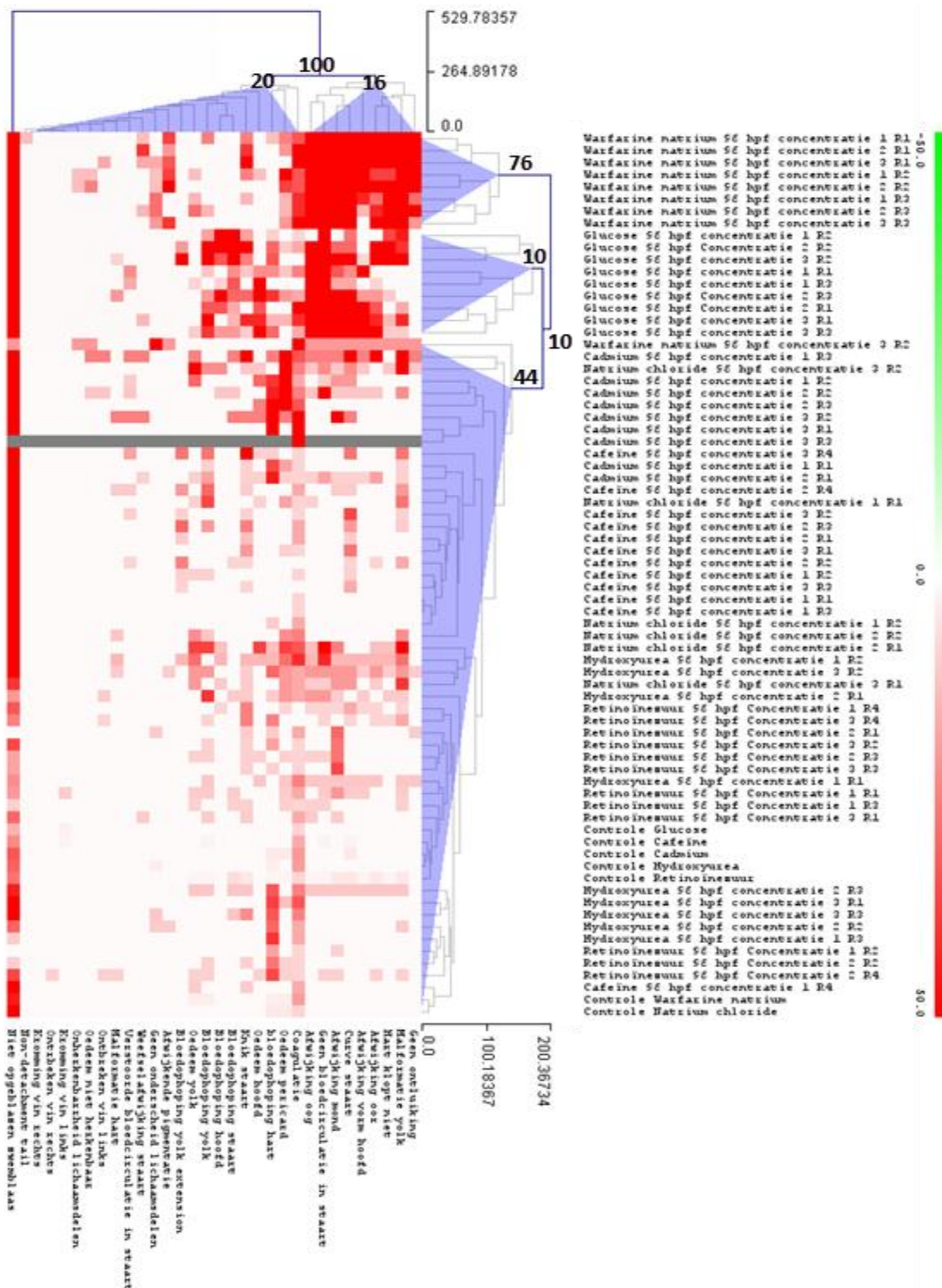
De hiërarchische clustering op 96 hpf, geeft een onderverdeling weer in drie grote groepen (Figuur 7), waarvan een eerste bestaat uit nagenoeg alle replicaten en concentraties van warfarine natrium. Hierbij wordt een bootstrapwaarde van 76 teruggevonden, d.i. de afstand tussen de verschillende clusters, wijzend op een zeer grote afstand van warfarine natrium met de overige clusters.

Een tweede cluster wordt gevormd door alle experimentele waarden van glucose. Hieruit blijkt dat glucose goed onderscheiden wordt van de overige groepen, maar dus ook een grotere afstand neemt van de controle groep, waardoor deze een vals positief resultaat representeert.

De derde, en laatste, cluster bestaat uit al de overige replicaten van de teratogene stoffen cadmium, hydroxyurea, retinoïnezuur, cafeïne en de niet-teratogene stof natriumchloride. In tegenstelling tot de brede verspreiding aan replicaten op 72 hpf (figuur niet getoond), clusteren de replicaten op 96 hpf beter samen, hoewel er nog vele uitzonderingen zijn.

Er kan eveneens geobserveerd worden welke parameters samen clusteren. Hierbij worden drie grote groepen van clusters teruggevonden. Een niet opgeblazen zwemblaas, met een bootstrap waarde van 100, vormt de eerste groep. De overige twee clusters bevatten enerzijds afwijkingen die zich zeer frequent voordoen bij warfarine natrium, een model teratogene stof,

en anderzijds eindpunten die algemeen minder vaak geobserveerd kunnen worden. Tot deze eerste groep behoren o.a. de parameters: geen ontluiking, oedeem pericard, en verstoorde bloedcirculatie in de staart.



Figuur 7: Heatmap bekomen na een hiërarchische clustering met euclidische afstand en average linkage methode. Deze clustering representeert de morfologische data op 96 hpf. Hierbij wordt het percentage aan verschillende morfologische eindpunten weergegeven. De kleurschaal wordt in dit geval gedefinieerd van wit tot rood, met 0% afwijkingen tot ≥50% afwijkingen respectievelijk. Indien er geen data beschikbaar is voor een welbepaald eindpunt, wordt dit weergegeven aan de hand van een grijze kleur. De blauwe driehoeken geven de zogenaamde hot groups weer, waarbij er gekozen werd voor 3 terminale nodes voor zowel de stoffen, als de morfologische eindpunten.

De visualisatie van de hiërarchische clustering op 72 hpf, geeft eveneens een onderverdeling weer in drie groepen (figuur niet getoond). De verschillende replicaten en concentraties van de teststoffen komen echter zeer verspreid voor. Een clusteranalyse aan de hand van percentages die beide tijdstippen representeren, vertoont eveneens drie grote clusters (figuur niet getoond). De verschillende replicaten van de afzonderlijke stoffen komen hierbij gedeeltelijk samen voor, echter opnieuw met vele uitzonderingen. Bovendien komen de verschillende concentraties van de stoffen relatief verspreid voor.

4.4.2 Clusteranalyse van een combinatie van morfologische en fysiologische data

Na een basisclassificatie te hebben opgesteld, werden vervolgens de morfologische data gecombineerd met de fysiologische data, om te evalueren of deze data een meerwaarde bieden voor het classificatie systeem.

De hiërarchische clustering van de verschillende stoffen op 96 hpf, vertoont een opdeling van de stoffen in zes clusters (Figuur 8), waarvan er vier bestaan uit slechts één replicaat.

Een vijfde groep bestaat uit alle replicaten van warfarine natrium en de zesde clusters omvat alle overige experimentele waarden. Hierbij wordt opgemerkt dat de replicaten en concentraties van zowel warfarine natrium, glucose als cafeïne nagenoeg allemaal samen clusteren. Bovendien groeperen een deel van de replicaten van hydroxyurea en retinoïnezuur eveneens samen.

Tot slot werd er eveneens een clustering uitgevoerd aan de hand van de verschillende eindpunten. Hierbij worden zes groepen teruggevonden, waarbij een duidelijke scheiding zichtbaar wordt tussen de morfologische en fysiologische parameters. Dit is niet verwonderlijk, aangezien de morfologische eindpunten enkel gescoord worden op een positieve manier. Dit in tegenstelling tot de fysiologische parameters die een positieve of negatieve score toegekend krijgen, afhankelijk van een stijging of daling van een bepaalde parameter ten opzichte van de controle. Daarboven blijkt er eveneens een tweesprong plaats te vinden tussen de fysiologische parameters, waarbij de draaibewegingen in het donker zowel een daling als stijging vertonen, in tegenstelling tot de overige fysiologische parameters die vooral een daling tonen bij een blootstelling aan chemicaliën.

Een heatmap werd eveneens verkregen na een hiërarchische clusteranalyse voor 72 hpf (figuur niet getoond), waarbij er vier clusters waargenomen werden. De replicaten van de verschillende teststoffen clusteren grotendeels samen, hoewel de verschillende concentraties verspreid voorkomen. Bij de hiërarchische clustering met een combinatie van beide

4.4.3 Observatie van de verschillende clustermethodes

De verschillende clustermethodes werden geobserveerd en vergeleken met elkaar, met het oog op het al dan niet samen clusteren van verschillende replicaten per concentratie per stof. Bovendien werd gecontroleerd of de verschillende concentraties per stof al dan niet samen clusteren. Deze resultaten worden weergegeven in tabel 6.

Om deze reden wordt verder gewerkt met de clustermethode die via observatie potentieel tonen, d.i. een clusteranalyse op basis van morfologische data op 96 hpf, en een clusteranalyse op basis van morfologische en fysiologische data op 96 hpf.

Tabel 6: Observatie van de verschillende clustermethode in verband met het samen clusteren van verschillende replicaten en concentraties per stof.

Clustermethode	Tijdstip	Cluster observatie van de teststoffen	
		Replicaten	Concentraties
Morfologische data	72 hpf	Verspreid	Verspreid
	96 hpf	Gedeeltelijk samen	Gedeeltelijk samen
	72 en 96 hpf	Gedeeltelijk samen	Verspreid
Morfologische en fysiologische data	72 hpf	Verspreid	Verspreid
	96 hpf	Gedeeltelijk samen	Gedeeltelijk samen
	72 en 96 hpf	Gedeeltelijk samen	Verspreid

4.5 Significance Analysis of Microarrays (SAM-analyse)

Na een clusteranalyse te hebben voltooid, werd aan de hand van een SAM-analyse (*Eng. Significance Analysis of Microarrays*) nagegaan welke parameters significant bijdragen tot de classificatie van de verschillende stoffen. Deze analyse werd enkel uitgevoerd op de beste clustermethodes, zoals beschreven in de vorige paragraaf.

De SAM-analyse werd uitgevoerd op twee verschillende wijzen. Tijdens een eerste methode werden de verschillende stoffen ingedeeld in acht groepen, waarbij de verschillende replicaten en concentraties van één stof een groep vormde.

Een tweede methode daarentegen bestond uit het indelen van de verschillende stoffen in een teratogene en een niet-teratogene groep, waarbij glucose, natriumchloride en de verschillende controles tot deze laatste groep behoorde.

De resultaten worden weergegeven in tabel 7. Hierbij wordt aangeduid welke parameters significant bijdragen tot de clustering op basis van de eerste en tweede methode.

Tabel 7: Significante parameters die bijdragen tot het clusteren van verschillende stoffen (methode 1) en teratogene versus niet teratogene stoffen (methode 2), aangeduid door middel van een sterretje (*).

Parameters die significant bijdragen tot de clustering (*)	SAM-analyse: methode 1		SAM-analyse: methode 2	
	Morfologische data	Combinatie morfologische en fysiologische data	Morfologische data	Combinatie morfologische en fysiologische data
Coagulatie	*	*		
Geen onderscheid lichaamsonderdelen	*	*		
Geen ontluiking	*	*	*	*
Curve staart	*	*		
Weefselafwijking staart	*	*		
Oedeem hoofd	*	*	*	*
Oedeem pericard	*	*		
Oedeem yolk	*	*		
Oedeem niet herkenbaar	*	*		
Bloedophoping staart	*	*	*	*
Bloedophoping hoofd	*	*		
Bloedophoping hart	*	*	*	*
Bloedophoping dooier	*	*	*	*
Bloedophoping dooierverlenging	*	*		
Malformatie dooier	*	*		
Geen bloedcirculatie in de staart	*	*	*	*
Verstoorde bloedcirculatie in de staart	*			
Hart klopt niet	*	*		
Afwijking hoofd	*	*		
Afwijking oor	*	*		
Afwijking mond	*	*		
Afwijking oog	*	*		
Afwijkende pigmentatie	*	*		
Niet opgeblazen zwemblaas	*	*		
Al de fysiologische parameters, behalve de duur per beweging en hartslag		*		*

5 Discussie

Talrijke studies hebben reeds de geschiktheid van zebraisembryo assays onderzocht om het teratogeen potentieel van chemische stoffen in zoogdieren te voorspellen (Teixidó et al., 2012). De resultaten zijn veelbelovend, maar bijkomende inspanningen zijn nodig voor de standaardisatie van de methodologie.

Deze studie trachtte hieraan bij te dragen door het karakteriseren van eindpunten, gerelateerd aan ontwikkelingsstoornissen, door middel van het opstellen van een gestandaardiseerde beslissingsboom.

In een tweede luik wordt getracht een biologisch classificatiesysteem te ontwikkelen, waardoor chemische stoffen op een snelle manier geclassificeerd kunnen worden op basis van

deze morfologische, specifieke eindpunten. Hiertoe wordt nagegaan of het integreren van hogere fysiologische eindpunten een gevoeliger en robuuster classificatiesysteem oplevert.

5.1 Beslissingsboom

Er werd een beslissingsboom opgesteld om een uniforme en gestandaardiseerde scoring van zebrawislarven mogelijk te maken. Hiervoor werd gekozen om een groot aantal verschillende morfologische eindpunten in deze scoringsmethode op te nemen.

Deze eindpunten werden enerzijds gekozen aan de hand van een preliminaire blootstelling aan cafeïne en retinoïnezuur, en anderzijds werden bijkomende eindpunten toegevoegd op basis van de literatuur. Hierdoor kan het scoringssysteem een bias vertonen naar de chemicaliën die in de huidige studie gebruikt worden. Bovendien bestaan er nog additionele afwijkingen die niet in dit scoringssysteem worden opgenomen, zoals het ontbreken van somietvorming en axiale kromming. Er kunnen bijgevolg bepaalde klassen van stoffen zijn die afwijkingen veroorzaken die niet in dit systeem werden opgenomen.

Bovendien werd er gekozen om gebruik te maken van additieve en mutueel exclusieve scoringssystemen. Deze systemen werden echter nog niet toegepast in bestaande zebrawisembryo assays.

Bijgevolg is het ontwikkelde scoringssysteem niet noodzakelijk universeel toepasbaar en moet het nog verder geoptimaliseerd worden voor gebruik in een breder toepassingsgebied.

5.2 Clusteranalyse op basis van de morfologische en fysiologische data

5.2.1 Interpretatie van de classificatie van de teststoffen

In tegenstelling tot de brede verspreiding van de replicaten op 72 hpf (figuur niet getoond), wordt een betere clustering van replicaten waargenomen op 96 hpf en bij een combinatie van beide tijdstippen, hoewel er ook dan nog uitzonderingen zijn.

Ook de testconcentraties per stof komen doorgaans verspreid voor, hoewel 96 hpf opnieuw een meer betrouwbare clustering oplevert. Deze waarnemingen kunnen verklaard worden door het feit dat er meer significante effecten werden waargenomen op 96 hpf. Vooral de replicaten en testconcentraties van warfarine natrium en glucose clusteren in dat geval nagenoeg altijd samen, twee stoffen die de meeste morfologische en fysiologische stoffen induceerden. Het vervolg van deze discussie is dan ook gebaseerd op de twee meest betrouwbare clusterings: op basis van morfologie op 96 hpf, en op basis van zowel morfologie als fysiologie op 96 hpf.

Nagenoeg alle clustermethodes classificeren warfarine natrium als teratogene stof, waarbij steeds de grootste afstand wordt waargenomen van de overige teststoffen. Hierbij clusteren eveneens de verschillende replicaten en de verschillende testconcentraties samen. Uit de heatmaps en de morfologische taartdiagrammen, kon afgeleid worden dat warfarine natrium in nagenoeg alle eindpunten afwijkingen veroorzaakte. Warfarine natrium wordt in de literatuur dan ook beschreven als een model teratogene stof (Gustafson et al., 2012; Weigt et al., 2012). Het is een anticoagulans en vitamine K antagonist die interfereert met de vitamine K-afhankelijke posttranslationale carboxylatie van glutamylresiduen van bepaalde eiwitten (van Driel et al., 2002). Bijgevolg inhibeert warfarine natrium de vitamine K-afhankelijke synthese van eiwitten, die een rol spelen in de opbouw van bot, kraakbeen, stolling en de ontwikkeling van het centraal zenuwstelsel (Hirsh et al., 2001; van Driel et al., 2002; Weigt et al., 2011).

Na het analyseren van de hiërarchische clusterings werd echter opgemerkt dat de replicaten en testconcentraties van glucose steeds terecht komen in een nabijgelegen, of zelfs eenzelfde, cluster als deze van warfarine natrium. In voorgaande studies, waarbij glucose als negatieve controle werd gebruikt, werden echter slechts lichte of geen significante morfologische veranderingen waargenomen, en er dus geen teratogeniteit of embryotoxiciteit geobserveerd werd (Selderslaghs et al., 2009; Teixidó et al., 2012). Hierdoor wordt glucose beschouwd als een vals positief resultaat, aangezien dit een niet-teratogene stof is.

De teratogene stoffen cafeïne, cadmium, hydroxyurea en retinoïnezuur worden meestal tot één grote cluster geclassificeerd met steeds een wisseling in rangschikking, afhankelijk van de gebruikte clustermethode. Hierdoor wordt de interpretatie van mogelijke patronen gecompliceerd. Bovendien behoren natriumchloride, een niet-teratogene stof, en de controles eveneens tot deze grote cluster. Daarom kan deze groep van stoffen beschouwd worden als zwak tot niet teratogenen.

Cadmium en cafeïne kunnen ondergebracht worden in de zwak teratogene groep, niettegenstaande ze voor zoogdieren als schadelijk voor de ontwikkeling worden geacht (Hsu et al., 2013; Teixidó et al., 2012; Yeh et al., 2012). Deze twee stoffen hebben echter geen gekend gemeenschappelijk werkingsmechanisme, waardoor het samen clusteren van deze chemicaliën enkel verklaard kan worden op basis van de eindpunten die deze stoffen induceren, allicht via verschillende pathways en processen (zie paragraaf 5.2.2).

Cadmium induceert oxidatieve stress en inhibitie van DNA herstel (Hsu et al., 2013). Het cellulaire metabolisme wordt hierdoor negatief beïnvloed, wat kan leiden tot een stilstand van

de celcyclus en celdood (DeSesso, 1979). De inductie van oxidatieve stress wordt eveneens teruggevonden voor hydroxyurea. De hydroxylamine groep in HU interageert met zuurstof om het zeer reactieve hydroxyl radicaal en waterstofperoxide te produceren (Banh and Hales, 2013). Daarom kan verwacht worden dat, door de gelijkende inductie van mechanismen, deze stoffen samen clusteren. In de huidige studie kan dit echter niet waargenomen worden, waarbij hydroxyurea tot de niet-teratogene stoffen gerekend wordt.

Hoewel in de huidige studie retinoïnezuur en hydroxyurea op basis van de hiërarchische clusteringen als niet-teratogeen naar voor komen, werden deze stoffen in de literatuur als teratogene stoffen voor zebrafisembryo's gekarakteriseerd (Selderslaghs et al., 2009). De afwezigheid van een teratogeen potentieel voor deze stoffen lijkt dan ook eerder onwaarschijnlijk.

Het voorkomen van een vals positief resultaat (glucose) en twee vals negatieve resultaten (hydroxyurea en retinoïnezuur) kan deels zijn oorsprong hebben in de keuze van de gebruikte testconcentraties. Vooral de testconcentraties van glucose zijn beduidend hoger dan deze gebruikt in de literatuur. De huidige blootstellingsconcentraties werden echter gekozen op basis van het LSECx principe, om vervolgens dit concept te evalueren. Hierbij blijken zeer hoge concentraties aan glucose nodig te zijn om een eerste effect te induceren. Dit effect gaat echter gepaard met het induceren van vele andere eindpunten door osmotische stress. Uiteraard veroorzaakt elke stof toxische effecten bij een voldoende hoge concentratie. De classificatie tussen teratogene en niet-teratogene stoffen is daarom sterk afhankelijk van een juiste keuze van de blootstellingscondities. Hoewel in deze studie getracht werd equitoxische en correct gekozen blootstellingsscenario's te hanteren, wordt uit deze resultaten duidelijk dat verdere optimalisatie op dit gebied noodzakelijk is.

In een voorgaande studie (Maex, 2012) kwamen hydroxyurea en retinoïnezuur naar voor als sterk teratogeen. Hierbij clusteren hydroxyurea en cadmium eveneens samen, waardoor deze resultaten bijdragen aan de mogelijke hypothese in verband met gelijkende werkingsmechanismen van deze stoffen. In de studie van Maex (2012) werden gelijkaardige morfologische eindpunten en tijds punten gebruikt. Er werd echter gebruik gemaakt van 10 verschillende testconcentraties per teststof. Indien hiervan de resultaten onderzocht werden bij een concentratie gelijkaardig aan deze gebruikt in de huidige studie, bleek hydroxyurea eveneens nagenoeg geen effecten te vertonen. Door het hanteren van zulk een concentratierange kon in deze voorgaande studie nadien een dosisresponscurve opgesteld worden. Vervolgens werd een clustering uitgevoerd op basis van TI-waardes, in tegenstelling

tot de huidige studie waarbij gebruik werd gemaakt van het percentage aan verschillende afwijkingen. Bovendien werd een ternair scoringssysteem gehanteerd (0=niet afwijkend, 0.5=mild afwijkend, 1= ernstig afwijkend), waarbij er rekening wordt gehouden met de ernst van de afwijkingen. Deze aspecten kunnen het verschil in teratogeen potentieel van hydroxyurea in de studie van Maex (2012) en de huidige studie verklaren.

Natriumchloride, een niet teratogene stof, werd verwacht samen te clusteren met de controles. Ook deze verwachting kan niet gestaafd worden aan de hand van de huidige clusteringen. Het is wel zo dat deze stof geclassificeerd wordt tot de grote groep van zwak tot niet-teratogene stoffen, waardoor een sterk teratogeen potentieel van deze niet-teratogene stof uitgesloten kan worden. Hoewel het van natriumchloride en glucose geweten is dat de afwijkingen het gevolg zijn van osmotische stress (Lange et al., 1995), zal het voor stoffen met een ongekend werkingsmechanisme moeilijk zijn om uit te maken of de afwijkingen al dan niet veroorzaakt worden door een teratogeen werkingsmechanisme op basis van enkel morfologische eindpunten.

De integratie van moleculaire informatie, door middel van genexpressiedata, biedt hierbij de mogelijkheid om het werkingsmechanisme van teratogene stoffen te achterhalen en bijgevolg een discriminatie te realiseren tussen de specifieke en de teratogeen specifieke werkingsmechanismen.

5.2.2 Interpretatie van de classificatie op basis van eindpunten

I. Morfologische eindpunten

In de huidige studie induceerde warfarine natrium veruit de meeste afwijkingen en werd bijgevolg dan ook toegeschreven aan de sterk teratogene groep van stoffen op basis van de hiërarchische clusteringen. Bovenop een zeer hoog mortaliteitspercentage, werd significant vertraagde ontluiking waargenomen. Ontluiking is een kritische periode, dat plaatsvindt tussen de 48 en 72 hpf (Hagenaars et al., 2011). Enerzijds is dit proces afhankelijk van de vertering van de chorion door ontluikingsenzymen (Frayssé et al., 2006) en anderzijds zijn de bewegingen van het embryo, na de enzymatische aanval, noodzakelijk om de chorion te verscheuren (Frayssé et al., 2006; Hagenaars et al., 2011). Warfarine natrium heeft bijgevolg duidelijk een toxisch effect op de chorionvertering en/of embryobeweging (von Westernhagen, 1988). Dit morfologisch eindpunt kan als specifiek voor warfarine natrium worden beschouwd, tenminste binnen de groep stoffen die in deze studie werd gebruikt. Een vertraagde ontluiking werd immers door geen enkele andere stof geïnduceerd.

Hoge mortaliteitspercentages werden eveneens teruggevonden voor glucose en cadmium. Hoewel de hoge mortaliteit van glucose te wijten is aan osmotische stress, kunnen de hoge percentages aan mortaliteit als specifiek eindpunt beschouwd worden voor zowel warfarine natrium als cadmium. Deze resultaten zijn in overeenkomst met de literatuur, waarbij Cheng et al. eveneens concentratieafhankelijke mortaliteit rapporteert voor cadmium en warfarine natrium (Cheng et al., 2000).

Bijkomende significante eindpunten die werden waargenomen voor warfarine natrium zijn afwijkingen in de staart, oedemen van het pericard, oedemen en malformaties van de dooier, cardiovasculaire afwijkingen, bloedophopingen in het hoofd en de dooier, afwijkingen aan het hoofd en een afwijkende pigmentatie. Nagenoeg al deze morfologische eindpunten werden echter ook teruggevonden na een blootstelling aan glucose. Het is bijgevolg niet verwonderlijk dat deze stof als sterk teratogeen wordt beschouwd, samen met warfarine natrium.

Naast een hoog mortaliteitspercentage werden bijkomend gelijkenissen in morfologische eindpunten waargenomen voor warfarine natrium en cadmium. Beide stoffen induceren immers oedemen van het pericard en de dooier en een ontbrekende bloedcirculatie in de staart. Deze drie eindpunten komen in geen enkele andere stof voor, met uitzondering van glucose. Bovendien werden deze parameters samen geclusterd op 96 hpf. Mogelijk is er daarom een verband tussen het voorkomen van deze eindpunten, waarbij een oedeem aan het pericard interfereert met de bloedcirculatie in de staart. Deze specifieke eindpunten voor cadmium werden eveneens teruggevonden in o.a. de studie van Cheng et al., waarbij oedemen van het pericard, malformaties van de dooier en veranderde axiale kromming werden waargenomen (Cheng et al., 2000). Deze laatste afwijking komt in de literatuur vaak terug (Hen Chow and Cheng, 2003), maar werd niet teruggevonden in de huidige studie. Dit kan verklaard worden doordat een axiale kromming niet werd opgenomen in de beslissingsboom. Deze parameter werd immers niet geobserveerd na een blootstelling aan cafeïne en retinoïnezuur, de twee stoffen die gebruikt werden voor het opstellen van de beslissingsboom. Deze feiten wijzen erop dat het ontwikkeld scoringsstelsel verder geoptimaliseerd dient te worden, zoals reeds eerder besproken.

Hoewel warfarine natrium, glucose en cadmium teruggevonden werden in aparte clusters, op basis van morfologische data op 96 hpf (zie figuur 7), kunnen bovengenoemde vergelijkbare eindpunten de opeenvolging van deze teststoffen in de hiërarchische clustering verklaren.

Cadmium neemt hierbij immers de kleinste afstand tot de clusters met glucose en warfarine natrium, in vergelijking met de overige teststoffen.

Na een blootstelling aan cadmium werd eveneens een significant percentage aan larven geobserveerd waarbij de zwemblaas nog niet was opgeblazen op 96 hpf. Dit specifiek eindpunt werd eveneens teruggevonden in glucose en cafeïne. De inflatie van de zwemblaas is zeer belangrijk voor het onderhouden van een neutraal drijfvermogen, nodig voor een minimaal energieverbruik (Finney et al., 2006; Hagenars et al., 2011). De productie van surfactant is hierbij cruciaal, waarbij een onderdrukking van deze biosynthese kan resulteren in een niet opgeblazen zwemblaas (Prem et al., 2000). Een bijkomende factor die cruciaal is voor de inflatie van de zwemblaas is het opwaarts zwemgedrag, om het lucht-water grensvlak te bereiken (Hagenars et al., 2011). Hierbij is het heen en weer bewegen van de staart belangrijk, waardoor anomalieën in de ontwikkeling, zoals afwijkingen in de staart, eveneens de inflatie van de zwemblaas in het gedrang brengen (Lindsey et al., 2010).

Afwijkingen in de staart, die geobserveerd werden na een blootstelling aan cafeïne en glucose, dragen op die manier bij tot het niet opblazen van de zwemblaas. Op basis van de huidige observaties kan deze parameter als een specifiek eindpunt worden beschouwd voor de drie bovengenoemde teststoffen. Bovendien kan een niet opgeblazen zwemblaas, samen met een vertraagde ontluiking, eveneens wijzen op een groeiachterstand, een parameter die op zich ook als afwijking beschouwd kan worden. Deze gemeenschappelijke parameters bij zowel cadmium, glucose als cafeïne kan de opeenvolging in de hiërarchische clustering van deze drie stoffen verklaren.

Uit de resultaten bekomen na een SAM-analyse, bleek dat al de bovengenoemde parameters significant bijdragen tot het clusteren van de verschillende teststoffen. Hieruit kan besloten worden dat deze eindpunten (hoog mortaliteitspercentage, vertraagde ontluiking, curve in de staart, oedemen van het pericard, oedemen en malformaties van de dooier, bloedophopingen in het hoofd en de dooier, afwijkingen aan het hoofd, afwijkende pigmentatie, ontbrekende bloedcirculatie in de staart en een niet opgeblazen zwemblaas) specifiek zijn aan de teststof waartoe deze behoren. Er werd eveneens een SAM-analyse uitgevoerd waarbij verschillende stoffen werden ingedeeld in een teratogene en een niet-teratogene groep. Hieruit blijkt dat, in het licht van bovengenoemde parameters, enkel een ontbrekende bloedcirculatie in de staart en een vertraagde ontluiking significant bijdragen tot de clustering in teratogene en niet-teratogene stoffen. Aangezien in de huidige studie een clustering werd bekomen waarbij warfarine natrium, glucose en cadmium als meest teratogene stoffen naar voor komen, zijn

deze significante parameters niet verwonderlijk. Deze eindpunten komen immers enkel voor in deze teststoffen. Bovendien wordt hiermee bevestigd dat de vertraagde ontluiking een zeer specifiek eindpunt is voor warfarine natrium. Mogelijk kan dit een specifiek eindpunt zijn voor meerdere teratogene stoffen, maar om deze aanname te staven moeten meerdere sterk teratogene stoffen getest worden.

De specifieke eindpunten die significant bijdragen tot zowel het scheiden van de verschillende stoffen, als het scheiden van teratogene en niet-teratogene stoffen moeten bijgevolg zeker opgenomen worden in een toekomstige, meer volledige screeningstool.

De overige teststoffen, hydroxyurea, retinoïnezuur en natriumchloride, worden toegeschreven aan een groep van niet-teratogene stoffen, samen met de controles.

Hydroxyurea (HU) werd echter reeds zeer uitgebreid bestudeerd als een model teratogeen in zoogdieren (Banh and Hales, 2013). Een blootstelling aan hydroxyurea induceerde in de huidige studie enkel bloedophopingen in het hart. Ondanks het verwacht teratogeen potentieel van deze stof werden ook in andere studies met zebrafisembryo's slechts weinig afwijkingseffecten geobserveerd (Banh and Hales, 2013; Teixidó et al., 2012).

Naast het gelijkend werkingsmechanisme van hydroxyurea en cadmium, wordt er eveneens een gelijkenis in eindpunten waargenomen. De bloedophopingen in het hart dat als specifiek effect voor hydroxyurea wordt geobserveerd, worden eveneens waargenomen na een blootstelling aan cadmium. Vervolgens kan er mogelijk een link gelegd worden tussen de oxidatieve stress die beide stoffen induceren en het voorkomen van bloedophopingen in het hart.

Deze specifieke afwijking wordt eveneens waargenomen in retinoïnezuur, samen met afwijkingen in de mond. Retinoïnezuur wordt gesynthetiseerd door retinaldehyde dehydrogenase en reguleert de ontwikkeling door het activeren van gentranscriptie op verschillende locaties in het embryo (Dupé et al., 2003; Matt et al., 2005; Mic et al., 2002; Mic et al., 2004). De exogene toediening van RA verstoort de signaalfuncties van het endogeen RA. In de literatuur blijkt dit te resulteren in onder meer afwijkingen van het centrale zenuwstelsel, craniofaciale structuren, skeletale elementen, cardiovasculaire malformaties en afwijkingen van de ledematen, hersenen, ogen en schildklier (Brannen et al., 2010; Matt et al., 2005; Mic et al., 2002; Ross et al., 2000; Sporn et al., 1994). Het verwacht sterke teratogeen karakter van deze stof kwam in de huidige studie echter niet duidelijk tot uiting. Vermits hydroxyurea en retinoïnezuur in de huidige studie over het algemeen geen

teratogene afwijkingen veroorzaakten, is het clusteren van deze twee stoffen op basis van hun morfologisch profiel bij de niet-teratogene teststoffen echter niet verwonderlijk.

Uit deze resultaten blijkt duidelijk dat een verdere optimalisatie van de blootstellingsconcentraties noodzakelijk is, zoals reeds eerder vermeld. Ondanks de relatief lage geteste concentraties, worden bloedophopingen in het hart geïnduceerd voor beide stoffen. Deze parameter kan dus beschouwd worden als een specifiek eindpunt die deze stoffen induceren. Bovendien geeft dit aan dat er zelfs bij lage concentraties afwijkingen geïnduceerd kunnen worden. Dit wijst op het teratogeen potentieel van deze stoffen indien deze getest zouden worden met meer relevante concentraties.

Uit de resultaten van de SAM-analyse blijkt dat deze parameter significant bijdraagt tot het indelen van de verschillende teststoffen in aparte clusters. Dit eindpunt draagt echter niet significant bij tot het scheiden van teratogene en niet-teratogene stoffen. Dit kan verklaard worden doordat de meest teratogene stof, warfarine natrium, die correct geclassificeerd werd in de huidige studie, deze parameter niet vertoont. Bijkomend vertoont ook glucose bloedophopingen in het hart, een stof die als niet-teratogeen werd ingedeeld in de SAM-analyse om een onderscheid te kunnen maken tussen teratogene en niet-teratogene stoffen.

Tenslotte induceren glucose en natriumchloride, twee niet-teratogene stoffen, eveneens verschillende afwijkingen na een blootstelling. Deze stoffen kunnen, bij een blootstelling aan hoge concentraties, zware osmotische stress induceren, waardoor de geobserveerde afwijkingen niet direct gerelateerd kunnen worden aan teratogene mechanismen (Lange et al., 1995). De osmotisch geïnduceerde observaties voor natriumchloride en glucose gelden eveneens voor de afwijkingen die in de volgende paragrafen besproken zullen worden.

In een vervolgstudie kunnen eventueel gewichten toegekend worden aan de belangrijkste parameters die discriminerend zijn tussen teratogene en niet-teratogene stoffen, bepaald aan de hand van de SAM-analyse. In de huidige studie kwamen de volgende parameters in aanmerking om teratogene van niet-teratogene stoffen te scheiden: geen bloedcirculatie in de staart, oedeem van het hoofd, vertraagde ontluiking en een bloedophoping in de dooier, het hoofd en de staart. De patronen in eindpunten die in de huidige studie aan de hand van SAM geïdentificeerd werden, kunnen echter nog te sterk afhankelijk zijn van de gebruikte dataset en zijn mogelijks nog niet volledig generaliseerbaar.

Een bijkomende morfologische parameter die werd geëvalueerd in de huidige studie is de lengte van de zebrawislarven. Hierbij werd een significante daling in lengte geïnduceerd voor

de verschillende concentraties ten opzichte van de controle bij een blootstelling aan warfarine natrium, glucose, cadmium en cafeïne. Hierbij kon er echter geen duidelijk dosis-responsrelatie teruggevonden worden, hoewel er een zeer sterke daling waargenomen wordt in lengte voor warfarine natrium. Weigt et al. toonden eveneens een achterstand in groei aan en bijgevolg een significante daling in lengte (Weigt et al., 2012).

Een zwakke daling in lengte wordt waargenomen voor natriumchloride en geen verandering in lengte bij hydroxyurea en retinoïnezuur. In een studie van Teixidó et al. werd echter een significante daling waargenomen in de lengte van de staart na een blootstelling aan retinoïnezuur vanaf 5 nM (Teixidó et al., 2012). Het gebrek aan afwijkingen in de huidige studie, kan bijgevolg verklaard worden doordat de hoogste testconcentratie slechts 3.019 nM was. Na een blootstelling aan hydroxyurea daarentegen werden overeenkomstige resultaten gerapporteerd, waarbij er geen significant effect werd waargenomen in lengte (Teixidó et al., 2012). De bekomen resultaten zijn in overeenstemming met de classificatie van deze stoffen op basis van de hiërarchische clusterings met morfologische data.

In de literatuur worden echter tegenstrijdige resultaten gepubliceerd. Chen et al. en Pruvot et al. toonden aan dat cafeïne een kortere lichaamslengte induceert (Chen et al., 2008; Pruvot et al., 2012), zoals geobserveerd in de huidige studie. Teixidó et al. daarentegen rapporteerde dat er geen significante verschillen waren in staartlengte na een blootstelling aan cafeïne (Teixidó et al., 2012). De verschillende effecten kunnen te wijten zijn aan het verschil in meetprocedure van de lengte. In de studie van Teixidó et al. werd immers de staartlengte gemeten in tegenstelling tot de totale lichaamslengte die gemeten werd in de huidige studie. Indien deze parameter opgenomen wordt in een toekomstige screeningstool, zal bijgevolg de volledige lichaamslengte gemeten moeten worden.

Door de grote overeenkomst van deze data met de clusterings, wordt besloten dat de lengte van zebrawislarven een geschikte parameter is voor classificatiedoeleinden. Dit wordt gestaafd aan de hand van de SAM analyse, waarbij deze parameter significant bijdraagt tot de clustering van zowel de verschillende stoffen, als de scheiding van teratogene en niet-teratogene chemicaliën.

In een toekomstige studie zou het meten van de lengte op verschillende tijdstippen in de ontwikkeling eventueel een toegevoegde waarde bieden aan de lengtebepaling. Hierdoor kan de groei doorheen de ontwikkeling van het zebrawisembryo onderzocht worden. Bijgevolg

kan deze parameter, samen met de ontluiking en het opblazen van de zwemblaas, indicaties geven over een mogelijke groeiachterstand.

II. Fysiologische profielen

Naast het opstellen van morfologische profielen, werden eveneens fysiologische profielen opgesteld om een sterker classificatiesysteem te ontwikkelen, maar ook om informatie te verschaffen over de mate van toxiciteit van de geteste stoffen. De fysiologische eindpunten die hierbij gehanteerd werden zijn de hartslag van zebravisembryo's en de zwemcapaciteit van zebravislarven.

a) Hartslag

In de huidige studie werd de hartslag van blootgestelde embryo's op 24 hpf vergeleken met controle-embryo's per conditie en per teststof. De resultaten tonen een significante daling aan van de hartslag in blootgestelde embryo's voor nagenoeg alle stoffen. Er is echter weinig onderzoek verricht naar effecten op de hartslag door het blootstellen aan chemische stoffen. De morfologische afwijkingen, die worden waargenomen ter hoogte van het hart, kunnen mogelijk een effect hebben op de hartslag. Het hart neemt echter hemodynamische stimuli waar en reageert hierop om een correcte cardiogenese te realiseren. Het hart zal bijgevolg niet normaal ontwikkelen bij een abnormale hartslag en bloedsomloop (Miyasaka et al., 2010). De waargenomen morfologische afwijkingen aan het hart voor de verschillende stoffen kunnen dus enerzijds een oorzaak, maar anderzijds ook een gevolg zijn van een gedaalde hartslag.

De patronen in hartslag lijken in eerste instantie nagenoeg overeen te komen met de patronen in lengte. Er kon echter geen significante correlatie gedetecteerd worden tussen beide parameters ($r = 0.3199$, p -waarde = 0.0970).

Uit de resultaten blijken vooral glucose en warfarine natrium een invloed te hebben op de hartslag, waarbij deze significant daalde voor alle geteste concentraties, niet enkel ten opzichte van de controle, maar eveneens ten opzichte van elkaar. Deze stoffen worden dan ook als sterk teratogeen geclassificeerd.

Er werden eveneens dalingen in hartslag waargenomen voor de overige stoffen, echter in mindere mate en vaak pas vanaf hogere concentraties. Deze stoffen worden dan ook samen geclusterd in een groep van zwak tot niet-teratogene stoffen.

Cafeïne blijkt hierbij een invloed te hebben op een speciaal type van kaliumkanalen die bekend staan als de menselijke ether-à-go-go (hERG) kanalen, aanwezig in de cellen van de hartspier (Kiehn et al., 1996; Rana et al., 2010). Het blokkeren van deze kanalen resulteert in

bradycardie, d.i. een afname in hartslag (Wang et al., 1998). De cardiovasculaire effecten van zowel cafeïne als de overige teststoffen blijven echter ondermaats begrepen (Gao and Jacobson, 2012; Yang et al., 2009a; Yu et al., 2009).

Tot slot vertoont retinoïnezuur het zwakste effect op de hartslag, waarbij deze significant daalt ten opzichte van de controle, maar waarbij geen concentratieafhankelijkheid waargenomen kan worden. Ook deze resultaten worden weergegeven in de hiërarchische clustering doordat retinoïnezuur als niet-teratogene stof geclassificeerd wordt. Het teratogeen potentieel van deze stof komt hierdoor in de huidige studie opnieuw niet duidelijk tot uiting. Het wordt echter aangenomen dat retinoïnezuur als chemisch signaal optreedt tijdens het determineren van hartcellen (Hochgreb et al., 2003; Simões-Costa et al., 2005). Experimenten hebben aangetoond dat een overmaat aan retinoïnezuur leidt tot een verkorting van de hartbuis (Markowitz, 2012; Waxman and Yelon, 2009) en een reductie van het aantal atriale en ventriculaire cellen (Markowitz, 2012; Waxman and Yelon, 2009). Deze afwijkingen kunnen vervolgens resulteren in een abnormale hartslag.

Doordat de hartslag daalt in alle geteste condities kan deze parameter als specifieke indicator voor teratogeniteit en/of toxiciteit in twijfel getrokken worden. Ook de SAM analyse geeft aan dat de hartslag niet significant bijdraagt tot het clusteren van de verschillende stoffen en tot het onderscheiden van teratogene en niet-teratogene stoffen. Bovendien werd er geen correlatie aangetoond tussen de hartslag en de lengte, een parameter die wel significant bijdraagt aan de clustering. Om deze parameter echter te kunnen opnemen in toekomstige studies zou een drempelwaarde gedefinieerd moeten worden, namelijk vanaf wanneer (aantal hartslagen per minuut) een effect op de hartslag als teratogeen beschouwd kan worden. Hiertoe kan men gebruik maken van dosis-respons-relaties. In de huidige studie werden deze relaties duidelijk geobserveerd voor warfarine natrium en glucose. Deze kunnen echter niet wiskundig beschreven worden, doordat er geen dosis-respons curven opgesteld kunnen worden. In de huidige studie werden immers slechts drie testconcentraties gebruikt. Het gebrek aan een mogelijke drempelwaarde en wiskundig beschreven dosis-respons relaties tussen veranderende hartslag en een blootstelling aan sterk teratogene stoffen belemmert echter het gebruik van deze parameter in toekomstige studies. Om deze rede moeten bijkomende sterk teratogene stoffen getest worden, samen met een grotere concentratierange om deze parameter te evalueren en eventueel op te nemen als classificatietool.

b) Zwemcapaciteit

Tot slot werd de zwemcapaciteit van de zebravislarven onderzocht. Het is echter zeer moeilijk om te begrijpen hoe de fysiologische effecten correleren met gedragsveranderingen, zelfs voor goed begrepen werkingsmechanismen (Beauvais et al., 2001). Bovendien zijn de meeste studies gericht op neurotoxische stoffen (Selderslaghs et al., 2013). Neurotoxische schade kan immers resulteren in gedragsveranderingen, die vervolgens overleving en reproductie van de blootgestelde organismen kan benadelen (Beauvais et al., 2001).

In de huidige studie werd opgemerkt, in overeenstemming met de literatuur, dat zebravislarven een hogere activiteit vertonen gedurende een donkerperiode (Maximino et al., 2011; Padilla et al., 2011; Richendrfer et al., 2012). Een eerste hypothese om deze resultaten te verklaren is dat de donkerperiode de schaduw van een predator imiteert, waaraan de larven trachten te ontsnappen (Steenbergen et al., 2011). Een tweede hypothese stelt dat de schaduw die de donkerperiode representeert de zichtbaarheid voor predatoren limiteert. Bovendien kan de donkerperiode waargenomen worden als nacht, een tijdstip waarbij er geen predatoren aanwezig zijn, waardoor de larven vrijuit kunnen bewegen.

Na een blootstelling aan warfarine natrium werd in de huidige studie een significant gedaalde zwemcapaciteit van zebravislarven geobserveerd, waarbij vrijwel al de gemeten motiliteitsparameters beïnvloed werden, met uitzondering van de duur per beweging. Deze laatste parameters werd door geen enkele stof beïnvloed en wordt na een SAM-analyse dan ook buiten beschouwing gelaten, samen met de hartslag.

De geobserveerde resultaten blijken opnieuw de classificatie van warfarine natrium als sterk teratogene stof te ondersteunen. Ook glucose induceerde significante dalingen in zwemcapaciteit, echter niet te wijten aan neurotoxiciteit.

De psychoactieve stof cafeïne staat bekend om anxiogene gedragsreacties in zebravisembryo's te induceren (Egan et al., 2009; Pruvot et al., 2012; Wong et al., 2010), met een algemene daling in locomotorische activiteit bij hogere concentraties (Richendrfer et al., 2012). Deze waarnemingen zijn in overeenkomst met de geobserveerde resultaten in de huidige studie. Deze stof wordt in het huidig classificatiesysteem gekarakteriseerd als zwak teratogene stof, doordat de effecten die geïnduceerd worden in minder mate aanwezig zijn dan bij blootstelling aan warfarine natrium. Cafeïne blijkt hierbij te interageren met ryanodine receptoren (RyR) en adenosine receptoren (ADR) (Lazarus et al., 2012; Rana et al., 2010), die in overvloed aanwezig zijn in de spieren, het zenuwstelsel en cardiovasculaire systemen (Yeh et al., 2012). In het spierweefsel kan cafeïne deze receptoren activeren, waardoor calcium

ionen vrijkomen vanuit het sarcoplasmatisch reticulum. Spiermisvormingen kunnen vervolgens optreden, waaraan de reductie in locomotorische activiteit mogelijk toegeschreven kan worden (Chen et al., 2008; Pisaniello, 2003).

De daling in locomotorische activiteit werd eveneens waargenomen na een blootstelling aan cadmium, echter minder uitgesproken in vergelijking met cafeïne, waarbij het aantal draaibewegingen en genomen hoeken in mindere mate beïnvloed werden. Hierdoor kan verklaard worden waarom cadmium plots geclassificeerd wordt tot de niet-teratogene groep indien morfologische en fysiologische data gecombineerd worden.

Hierbij dient echter opgemerkt dat de verschillende replicaten en concentraties van cadmium in de clusterings zeer verspreid voorkomen. Dit betekent dat cadmium niet eenzelfde fysiologisch effect induceert in verschillende zebrafishlarven. Indien de ruwe data van cadmium bekeken wordt, worden inderdaad enerzijds stijgingen en anderzijds dalingen in de verschillende parameters van locomotorische activiteit geobserveerd. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat cadmium meerdere biologische werkingsmechanismen beïnvloedt, die zich elk uiten in een verschillend effect op zwemcapaciteit. Bovendien kunnen de waargenomen morfologische afwijkingen hiertoe bijdragen, waarbij zwaar afwijkende larven eventueel gevoeliger zijn voor een blootstelling aan cadmium en bijgevolg een grotere daling in zwemcapaciteit vertonen.

In tegenstelling tot de voorgaande blootstellingen, induceerde zowel hydroxyurea als retinoïnezuur opnieuw zeer weinig significante effecten, waardoor deze geclassificeerd worden als niet teratogene stoffen.

De clustering op basis van morfologische en fysiologische data is in overeenstemming met de resultaten die gevonden werden op basis van morfologische data. Enkel cadmium en cafeïne wordt in rangschikking gewisseld, doordat cadmium een mindere mate van fysiologische effecten induceert. Het is momenteel echter onduidelijk of de waargenomen afname van locomotorische activiteit te wijten is aan de geobserveerde morfologische afwijkingen of aan bijkomende effecten op de neurale ontwikkeling (Pruvot et al., 2012).

In een toekomstige studie moeten de blootstellingsconcentraties van zowel de niet-teratogene stoffen als de sterk teratogene stoffen zoals hydroxyurea en retinoïnezuur geoptimaliseerd worden om na te gaan of deze vervolgens correct geclassificeerd worden aan de hand van de morfologische en fysiologische eindpunten. Alvorens deze studies worden uitgevoerd kan er

echter niet definitief besloten worden of de verschillende parameters significant bijdragen tot de classificatie.

5.3 Geschiktheid van zebravisembryo's om het teratogeen potentieel in zoogdieren te voorspellen

In de huidige studie wordt de geschiktheid van zebravisembryo's om het teratogeen potentieel van chemische stoffen in zoogdieren te voorspellen onderzocht, op basis van een vergelijking tussen de experimentele ondervindingen in de huidige studie en de bestaande literatuur.

Cafeïne veroorzaakt in zowel ratten als muizen cardiovasculaire malformaties (Matsuoka et al., 1987; Selderslaghs et al., 2009) en skeletale defecten (Chen et al., 2008). Bij ratten werden eveneens embryo's waargenomen met een vertraging in het sluiten van de neurale buis en een onvolledige ontwikkeling van het hart, de ogen en de ledematen (Chen et al., 2008; Wilkinson and Pollard, 1994).

Er komt echter slechts een deel van de in zoogdieren geobserveerde effecten in de huidige studie terug, waaronder een curve en knik in de staart, die indicatief kunnen zijn voor skeletale malformaties, en een oedeem van het pericard, overeenkomstig met de cardiovasculaire malformaties (Teixidó et al., 2012; Yeh et al., 2012). Het anxiogeen effect dat naar voren komt in verband met de locomotorische activiteit in deze studie is in lijn met de menselijke reactie op cafeïne en knaagdierdata (Egan et al., 2009). Er is eveneens een mechanistische gelijkenis van effecten geïnduceerd door cafeïne, met een overeenkomst tussen de RyR en ADR receptoren die cafeïne beïnvloedt (Yang et al., 2009a). Bovendien is het hERG kalium kanaal in zowel de zebravis als de mens aanwezig (Rana et al., 2010).

Een blootstelling aan cadmium geeft aanleiding tot een verscheidenheid aan ontwikkelingsstoornissen in kuikens, muizen, ratten en kikkers (Hen Chow and Cheng, 2003). Cadmium induceert immers een vermindering in embryo lichaamsgrootte, groeiachterstand en degeneratie van de morula (Cheng et al., 2000). Cadmium induceert hierbij afwijkingen in de ruggengraat via een verlaging van de myotoomorganisatie, met een daling in lengte als gevolg. Deze desorganisatie zou te wijten zijn aan een vermindering van de productie van de myosine zware keten in de romp (Cheng et al., 2000; Frayssse et al., 2006). Deze afwijkingen werden eveneens teruggevonden in de huidige studie, waarbij een zeer hoog mortaliteitspercentage indicatief kan zijn voor de degeneratie van de morula. Bovendien werd de daling in activiteit in de huidige studie ook waargenomen in zowel ratten als in vlokreeften (Morillo-Velarde et al., 2011; Smith et al., 1985). Cadmium (Cd) beïnvloedt eveneens de transcriptie van een groot aantal genen in mensen (Kita et al., 2006; Takeda et al., 1994).

Hierbij blijken gelijkaardige genen in het zebravisembryo beïnvloed te worden, zoals genen met beschermende functies (Chen et al., 2007; Riggio et al., 2003).

Voor hydroxyurea kunnen slechts weinig gelijkenissen aangetoond worden tussen zebravisembryo's en zoogdieren. Hydroxyurea induceert naast oxidatieve stress ook replicatie stress. Deze stof is namelijk een mogelijke DNA-synthese-inhibitor, waarbij deze ribonucleoside difosfaat reductase inhibeert (Banh and Hales, 2013), resulterend in een snelle remming van DNA-replicatie (Chan et al., 2009; Sneed and Loeb, 2004). Een mechanistische gelijkenis kan waargenomen worden tussen zebravisembryo's en zoogdieren voor wat betreft de oxidatieve en replicatieve stress, waardoor macromoleculen zoals DNA, eiwitten en lipiden in het embryo gemodificeerd worden (Banh and Hales, 2013). Bovendien blijkt de reductie in locomotorische activiteit, die werd teruggevonden in de huidige studie eveneens geïnduceerd te worden in ratten (Fritz and Hess, 1980; Yoshida and Kosazuma, 1983).

Retinoïnezuur (RA) is een metabooliet van vitamine A (Ross et al., 2000), die actief is tijdens de vroege embryogenese en werd reeds aangetoond essentieel te zijn in vele processen in vertebraten (Mark et al., 2006; Selderslaghs et al., 2009; Shimosono et al., 2013). Exogeen vitamine A is teratogeen in o.a. muizen, ratten, konijnen, varkens, apen en zebravissen (Selderslaghs et al., 2009). Hierbij is er een mechanistische gelijkenis tussen zebravissen en zoogdieren, door het voorkomen van retinoïde receptor families (RARs) (Mic et al., 2002; Mic et al., 2004; Ross et al., 2000; Selderslaghs et al., 2009). De ontdekking van deze receptoren heeft geleid tot de huidige weergave van retinoïden als transcriptionele activatoren, die de genexpressie reguleren tijdens de embryonale ontwikkeling en differentiatie (Ross et al., 2000). Een ontregeling van RARs heeft opeenvolgende effecten op homeobox genen, die ofwel niet tot expressie komen of juist een overexpressie ondergaan op de verkeerde plaats en tijd, resulterend in teratogenese in zowel zebravisembryo's als zoogdieren (Mic et al., 2002; Mic et al., 2004; Ross et al., 2000; Selderslaghs et al., 2009).

In de huidige studie werd bovendien een gereduceerde locomotorische activiteit waargenomen. In de literatuur worden echter tegenstrijdige resultaten gerapporteerd, met enerzijds retinoïnezuur-geïnduceerde hypoactiviteit (Vorhees, 1974) en anderzijds retinoïnezuur-geïnduceerde hyperactiviteit (Adams, 1993; Church and Tilak, 1996; Vorhees, 1978; Vorhees, 1979) in ratten.

Tenslotte wordt warfarine natrium eveneens als een model teratogene stof beschouwd, die teratogene en letale effecten veroorzaakt in zebravisembryo's (Gustafson et al., 2012; Weigt

et al., 2012). De biologische beschikbaarheid van warfarine is sterk afhankelijk van het CYP-metabolisme (Miller et al., 2010; Zielinska et al., 2008). Er werden reeds enkele parallellen beschreven tussen het CYP-metabolisme van de mens en zebravis, zoals reeds besproken in de inleiding (Rubinstein, 2006; Weigt et al., 2012). Voor cumarinederivaten zijn echter nog geen teratogene effecten aangetoond in ontwikkelingstoxiciteitsstudies met zoogdieren, waardoor er momenteel geen concrete informatie beschikbaar is over het teratogene potentieel van warfarine in de mens (van Driel et al., 2002; Weigt et al., 2012). In de huidige studie, alsook in de literatuur, bleek deze stof echter duidelijk teratogeen te zijn (Gustafson et al., 2012; Weigt et al., 2011).

Gelijkaardige afwijkingen kunnen teruggevonden worden tussen de zebravisembryo en de mens na een blootstelling aan warfarine natrium. Nasale hypoplasie, kenmerkend voor humane foetussen blootgesteld aan warfarine, vertoont hierbij geen duidelijke analogie in zebravisembryo's, maar misvormingen van het hoofd kunnen wellicht beschouwd worden als corresponderend effect (Weigt et al., 2011). In tegenstelling tot mensen, maar gelijkaardig aan knaagdieren en konijnen, vertonen de zebravisembryo's bovendien een vertraging in de groei (Wangikar et al., 2004; Wangikar et al., 2007). In een studie van Cocchetto et al. werd eveneens een hypoactiviteit en een daling in verkennend gedrag in ratten aangetoond (Cocchetto et al., 1985; Ferland, 2012). Bovengenoemde parameters (afwijkingen in het hoofd, vertraging in groei en hypoactiviteit) werden eveneens in de huidige studie teruggevonden.

6 Besluit en toekomstperspectief

Om de effecten van stoffen te karakteriseren, werd in deze thesis een morfologisch scoringssysteem ontwikkeld in de vorm van een beslissingsboom, zodat een snelle en robuuste handleiding beschikbaar is voor het scoren van zebravisembryo's. Deze moet echter nog geoptimaliseerd worden om een gestandaardiseerd gebruik te kunnen realiseren.

Vervolgens werd per teststof een morfologisch profiel opgesteld, waardoor specifieke patronen van afwijkingen toegewezen kunnen worden aan verschillende teststoffen. Deze morfologische profielen laten een classificatie van stoffen toe op basis van hun teratogeen potentieel en de afwijkingen die hierdoor veroorzaakt worden. In het derde luik van deze masterproef werd een biologisch classificatiesysteem ontwikkeld op basis van hun morfologische specifieke eindpunten. Na het opstellen van fysiologische profielen, werden beide datasets gecombineerd. Hieruit kan besloten worden dat de integratie van hogere fysiologische eindpunten complementaire informatie biedt voor het classificeren van

chemicaliën. Er werd hierbij duidelijk waargenomen dat een scoring op 96 hpf de meest betrouwbare classificatie opleverde.

De huidige clustermethode dient echter nog verder geoptimaliseerd te worden. Te hoge concentraties leidden in de huidige studie immers tot afwijkingen na blootstelling aan niet-teratogene stoffen, terwijl teratogene eindpunten, die reeds in de literatuur geobserveerd werden, niet tot uiting kwamen door het gebruik van te lage concentraties. Bovendien kunnen de gebruikte eindpunten geoptimaliseerd worden door middel van de reeds uitgevoerde SAM analyse, waarbij parameters die een laag discriminerend vermogen vertonen om verschillende toxicanten te onderscheiden, uit de analyse verwijderd kunnen worden.

Een uitbreiding met genexpressiedata en biochemische parameters zal waarschijnlijk de gevoeligheid van de methode aanzienlijk verhogen.

Tot slot kan besloten worden dat het zebravisembryo een goed modelorganisme is voor zoogdiertoxiciteit, door de grote mate aan gelijkenissen voor zowel de biologische werkingsmechanismen als specifieke morfologische en fysiologische eindpunten voor verschillende chemicaliën. Bijkomende inspanningen zijn echter nodig voor het ontrafelen van o.a. de verschillende werkingsmechanismen in zebravis-embryo's. Bovendien zijn enkele parameters, zoals afwijkingen in extremiteiten, moeilijk te modelleren in dit modelsysteem.

7 Afkortingenlijst

Tabel 8: Alfabetische afkortingenlijst.

Afkorting	Betekenis
3V-principe	Vervangen, verminderen en verfijnen
ADR	Adenosine receptoren
ANOVA	Analysis of Variance
cAMP	Cyclisch adenosine monofosfaat
Caf	Cafeïne
Cd	Cadmium
CCW	Counterclockwise draaibewegingen
CW	Clockwise draaibewegingen
CYP	Cytochroom-P450 enzymstelsel
dpf	Days post fertilization (dagen na bevruchting)
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EC50	Effect Concentration (concentratie die bij 50% van de blootgestelde dieren effecten veroorzaakt)
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
ECHA	Europees Chemische Agentschap
ECOPA	The European Consensus Platform on Alternatives
ECVAL	Europees Centrum voor de Validatie van Alternatieve Methoden
ELS test	Early Life Stage test
EST	Embryonale Stamcel Test
FDR	False Discovery Rate
FEET	Fish Eleuthero Embryo Toxicity Test
FELS	Fish Early-life Stage Toxicity test
GMS	General Morphology Score
Glu	Glucose
HCE	High choriolytic enzyme
hERG	Human ether-à-go-go kalium kanaal
hpf	Hours post fertilization (uren na bevruchting)
HSPs	Heat Shock Proteins
HU	Hydroxyurea
ICH	Internationale Conferentie over Harmonisatie
Ko	Vitamine K epoxide
KH2	Vitamine K hydroquinon
LC50	Lethal Concentration (concentratie die bij 50% van de geteste organismen tot de dood leidt)
LCE	Low choriolytic enzym
LES	Left Eye System
LSECx	Lethal and Single Effect Concentration (concentratie waarbij x % van de geteste organismen tot de dood of een specifieke afwijking leidt)
LOEC	Loews observed effect concentration
MeV	Multi Experiment Viewer
MM test	Limb bud Mammalian Micromass test (zoogdieren micromassatest van de ledemaatknoep)
MS-222	Ethyl-3-aminobenzoaat methaansulfonaat

MTs	Metallothioneïnes
NaCl	Natriumchloride
NH ₃	Ammoniak
NO ₂ ⁻	Nitriet
NO ₃ ⁻	Nitraat
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
QSAR	Kwantitatieve structuur-activiteit relaties
RA	Retinoïnezuur
RARs	Retinoïnezuur receptoren
REACH	Registratie, Evaluatie en Autorisatie van Chemicaliën
RES	Right Eye System
RO water	Reverse Osmose water
ROS	Reactive Oxygen Species
RARs	Ryanodine receptoren
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SVM	Support Vector Machines
TO	Teratogene index (TI = LC50/EC50)
US EPA	U.S. Environmental Protection Agency
UV	Ultraviolet
WN	Warfarine natrium
WEC test	Whole Embryo Culture test
ZFET	Zebrafish Embryo Aquatic Toxicity Test