



Fische und Antidepressiva: Neurotoxische Effekte bei Embryonen des Zebraärlings (*Danio rerio*) nach Belastung mit Venlafaxin

Katharina Brotzmann (Brotzmann@uni-heidelberg.de), Maria Fischer (sms.fischer@googlemail.com), Thomas Braunbeck (Braunbeck@uni-hd.de)

Abstract

Als häufig verschriebenes Antidepressivum gelangt Venlafaxin zunehmend in Gewässer, wo es bereits in niedrigen Dosen die Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin in die präsynaptischen Vesikel an bestimmten Synapsen im Gehirn vermindert und so als selektiver Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI) die Neurotransmitter-Homöostase von Fischen beeinflussen kann. Beim akuten Fischembryotoxizitätstest entwickeln Embryonen des Zebraärlings Missbildungen und zeigen beim Schwimmen Gleichgewichtsstörungen; Verhaltensuntersuchungen belegen eine verminderte Aktivität im Coiling-Assay; Störungen des Seitenlinienorgans können im Neuromasten-Assay nicht belegt werden. Die Störung essentieller Verhaltensweisen in frühen Lebensstadien kann als Indikator für eine Entwicklungsneurotoxizität von Venlafaxin gewertet werden. Angesichts steigender Konzentrationen in europäischen Gewässern und möglicher Interaktion mit weiteren Antidepressiva kann von Venlafaxin eine Gefährdung der aquatischen Umwelt ausgehen.

Einleitung

Mit steigender Prävalenz gehören Depressionen zu den weltweit häufigsten psychologischen Erkrankungen: 2020 waren in Deutschland 16,9 %, in den Vereinigten Staaten 22,9 % und in Österreich 28 % der Bevölkerung betroffen (Statista 2025). In Deutschland stiegen von 2012 bis 2022 ärztliche Verordnungen zur medikamentösen Behandlung von Depressionen um > 30 % auf rund 1,7 Milliarden Tagesdosen an (Statista 2024). Einer der drei am häufigsten verschriebenen Wirkstoffe ist mit 79,9 Millionen Tagesdosen der Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI) Venlafaxin (Statista 2024). Durch unsachgemäße Entsorgung und unzureichende Entfernung in den Klärwerkanlagen gelangt Venlafaxin auch in Bäche, Flüsse und andere Gewässer (Mezzelani et al., 2018, Wilkinson et al., 2022). Nach einer Studie zur weltweiten Verschmutzung von Flüssen durch Arzneimittel wurden für Venlafaxin in europäischen und nordamerikanischen Flüssen Werte von bis zu 71,9 ng/L bzw. 110 ng/L gemessen (Wilkinson et al., 2022); ein Review aus dem Jahr 2018 berichtet sogar von 2,19 µg/L in Abwässern in Minnesota (Sehonova et al., 2018). In Anbetracht des stetig zunehmenden Eintrags von SSNRIs in Gewässer und des stark konservierten Neurotransmittersystems bei Wirbeltieren können Fische als Nichtzielorganismen durch die Wasserverschmutzung mit Antidepressiva beeinträchtigt werden (Sehonova et al., 2019, Wang et al., 2023). Aus dem Anstieg der Verschreibungen ergibt sich die Notwendigkeit eines Monitorings auf entwicklungsneurotoxische Effekte von Venlafaxin bei frühen

Entwicklungsstadien von Fischen, da diese als besonders empfindlich für Störungen in der Entwicklung des Nervensystems gelten (von Hellfeld et al. 2023; Yin and Horzmann 2024).

Material & Methoden

Zur Untersuchung der akuten Toxizität wurde der akute Fischembryotoxizitätstest (FET; OECD TG 236) mit Embryonen des Zebraärlings (*Danio rerio*) durchgeführt und nicht sowie wenig toxische Konzentrationen von Venlafaxinhydrochlorid (CAS 99300-78-4; Sigma Aldrich) identifiziert, um Effekte bei frühen Verhaltensweisen sowie neurodegenerative Effekte auf das Seitenlinienorgan zu untersuchen.

Akuter Fischembryotoxizitätstest (FET; OECD TG 236)

Der akute Fischembryotoxizitätstest nach OECD TG 236 (OECD 2013) wurde auf eine Expositionszeit von 120 Stunden verlängert, da nach Strähle et al. (2012) Embryonen des Zebraärlings nach der derzeit gültigen Tierversuchsverordnung (EU 2010) bis zu diesem Alter noch nicht als geschützte Lebensstadien betrachtet werden. Weniger als 1 h alte frisch befruchtete Eier wurden in 25 ml Kristallisationsschalen mit der jeweiligen Testlösung überführt, die unmittelbar vor Gebrauch angesetzt wurden. Nach einer Kontrolle auf Befruchtung wurden die Eier einzeln in 24-Well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) mit 1 ml Testlösung pro Embryo überführt, die 24 h mit den Testlösungen vorinkubiert wurden. Anschließend wurden die 24-Well-Platten mit Folie (SealPlate®, Dunn, Asbach, Deutschland) versiegelt, um Verdunstung und Kreuzkontamination zu verhindern, und in einen HettCube 600R-Inkubator (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei $26 \pm 1^\circ\text{C}$ unter einem 10/14-h-Hell-Dunkel-Regime inkubiert. Das Testmedium wurde alle 24 h erneuert (semistatische Exposition). Letale und subletale Effekte in den Embryonen wurden nach 24, 48, 72, 96 und 120 h gemäß OECD TG 236 (OECD 2013) und Nagel (2002) dokumentiert. Tests galten als valide, wenn in der Positivkontrolle (4 mg/L 3,4-Dichloranilin) nach 120 h eine Mortalität von $\geq 30\%$ auftrat, während die Mortalität in der Negativkontrolle (Kunstwasser) unter 10 % blieb. Im FET wurde Venlafaxin in drei unabhängigen Replikaten in 14 Testkonzentrationen zwischen 0,001 und 1000 mg/L geprüft.

Coiling Assay

Beim Coiling-Assay werden im Alter zwischen 21 und 47 h die spontanen Schwanzbewegungen von Fischembryonen als die ersten beobachtbaren lokomotorischen Aktivitäten videographisch erfasst (Brustein et al. 2003; Drapeau et al. 2002; Kimmel 1995; Saint-Amant and Drapeau 1998). Der detaillierte

Versuchsaufbau für den Coiling-Assay wurde von Zindler et al. (2019) beschrieben: Die Exposition der befruchteten Fischeier erfolgte kontinuierlich ab einem Alter von 1,5 h; Kunstwasser diente als Negativkontrolle. Nach 6 h wurden jeweils 5 regulär entwickelte Fischeier in 20 Kavitäten einer 24-Well-Platten mit kleinen Teflonringen und 1 ml Testlösung überführt (insgesamt 100 Eier pro Testlösung). Die 24-Well-Platten wurden bei $26 \pm 1^\circ\text{C}$ in einem Inkubator (HettCube 600R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) auf einer Acrylglasplattform platziert, unter welcher Infrarotstrahler (880 nm $40^\circ 5$ mm, Kingbright, Taiwan) installiert waren.

Die Bewegungen der Embryonen in den Eiern wurden jede Stunde 8 Minuten lang mit einer Basler acA1920-155um USB 3.0 Kamera (Ahrensburg, Deutschland) durch ein infrarotgefiltertes Basler M7528-MP F2.8 f75 mm Computerobjektiv (Filter: RG850, heliopan, Gräfelfing, Deutschland) videografiert (mpeg-4, 30 Frams/s). Die Filme wurden mit einem Media-Recorder 5 (Noldus, Wageningen, Niederlande) aufgezeichnet und mit DanioScope© 1.2 (Noldus; Einstellungen für alle 27 Videos identisch) auf Veränderungen von Graustufen analysiert. In jedem Video wurden einzelne Embryonen manuell als ein zu analysierender Bereich markiert. Als Endpunkte wurden „Mean Burst Duration“ und „Mean Burst Count/ Minute“ erfasst (im Folgenden als „Coil Duration (s)“ bzw. „Coiling Frequency (/min)“ bezeichnet). Die Daten wurden anschließend mit dem Generalized Additive Model in einem multivariaten Modellierungsansatz analysiert (Fischer et al., 2025). Venlafaxin wurde im Coiling Assay in 3 unabhängigen Replikaten in Konzentrationen von 0,1,1,10 und 25 mg/L untersucht.

Neuromasten-Assay

Um eventuelle Venlafaxin-induzierte Veränderungen in zentralen Sinnesorganen zu erfassen, wurde die Entwicklung des Seitenlinienorgans untersucht, eines Systems, dessen Beeinträchtigung im Sinne eines neurotoxischen Effekts zu Problemen mit normalem Schwimmen führen kann. In einem leicht modifizierten Neuromasten-Assay nach Stengel et al. (2017) wurden Embryonen unter semistatischen Bedingungen über 96 h mit 0, 1080 (EC_{10} 120 h FET), 344 (EC_{10} 96 h FET) und 172 $\mu\text{g/L}$ Venlafaxin (EC_5 96 h FET) belastet (4 Replikate à 3 Embryonen). Anschließend wurden die Neuromasten des Seitenlinienorgans in einer Doppelfärbung aus DAPI und DASPEI markiert (Kerne blau; Mitochondrien rot). Je Embryo wurden 9 ausgewählte Neuromasten in einem Nikon Eclipse 90i Epifluoreszenzmikroskop (Nikon, Tokio, Japan) untersucht, wobei die Fluoreszenzen der beiden Färbungen elektronisch übereinander gelegt wurden (NIS-Elements (AR 4.00.12 64 bit) Nikon, Tokio, Japan; Abb. 1). Die Fluoreszenzintensität wurde auf einer Skala mit Score Werten von 0 (kein Effekt) bis 3 (starker Effekt) semiquantitativ ermittelt (Abb. 1).

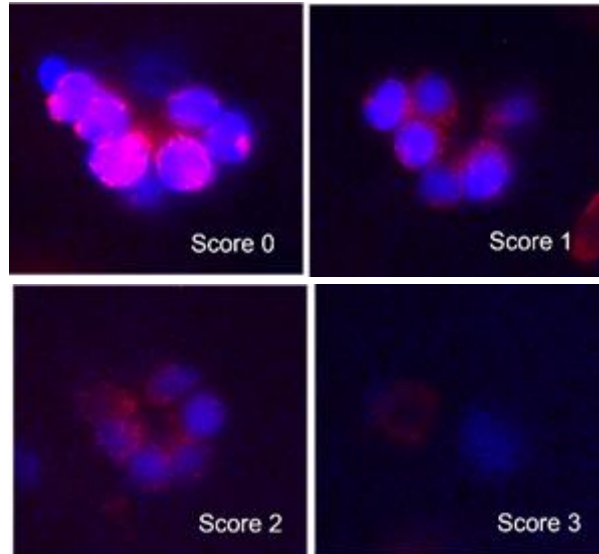


Abb.1: Semiquantitative Bewertung zusammengesetzter Neuromasten bei 96 h alten Embryonen des Zebrafährblings (*Danio rerio*): Score 0 = kein Effekt (Negativkontrolle= Score 1 = geringer Effekt; Score 2 = mittlerer Effekt; Score 3 = starker Effekt. Blau = DAPI-gefärbte Kerne; rot = DASPEI-gefärbte Mitochondrien.

Ergebnisse

Akuter Fischembryotoxizitätstest (FET)

Neben morphologischen Veränderungen wie Ödemen des Dottersacks und des Herzbeutels, Wirbelsäulendeformationen (Lordose, Kyphose) und deformierten Schwanzflossen(-säumen) bei Testkonzentrationen ab 296 mg/L war im FET die auffälligste Beobachtung die Unfähigkeit von 120 h alten Embryonen, nach Belastung mit $\geq 87,8$ mg/L Venlafaxin ihren Körper aufrecht im Wasser zu halten. Dieses erste Symptom neurotoxischer Effekte wurde mit einem EC_{10} -Wert von 1,08 mg/L ermittelt, einer Konzentration, die in den nachfolgenden Neuromasten-Assays als höchste Konzentration und im Coiling-Assay als mittlere Testkonzentration diente.

Coiling-Assay

Im Coiling-Assay wurden sowohl Venlafaxin-Konzentrationen im umweltrelevanten Bereich als auch Konzentrationen untersucht, die in Vorversuchen bereits eine Veränderung der Dauer des Coiling (s) gezeigt hatten. Die Dauer des Coiling zeigte eine signifikante Reduktion ab 1 mg/L Venlafaxin; der NOEC lag bei einer Testkonzentration von 0,1 mg/L (Abb. 2A). Für die Frequenz Coiling-Bewegungen konnten keine Effekte nachgewiesen werden (Abb. 2B).

Neuromasten-Assay

Pro Embryo wurden die Fluoreszenzwerte für 9 ausgewählte Neuromasten ermittelt; nach Belastung mit Venlafaxin-Konzentrationen zwischen 0,17 und 1,08 mg/L ergaben sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle (Abb. 3).

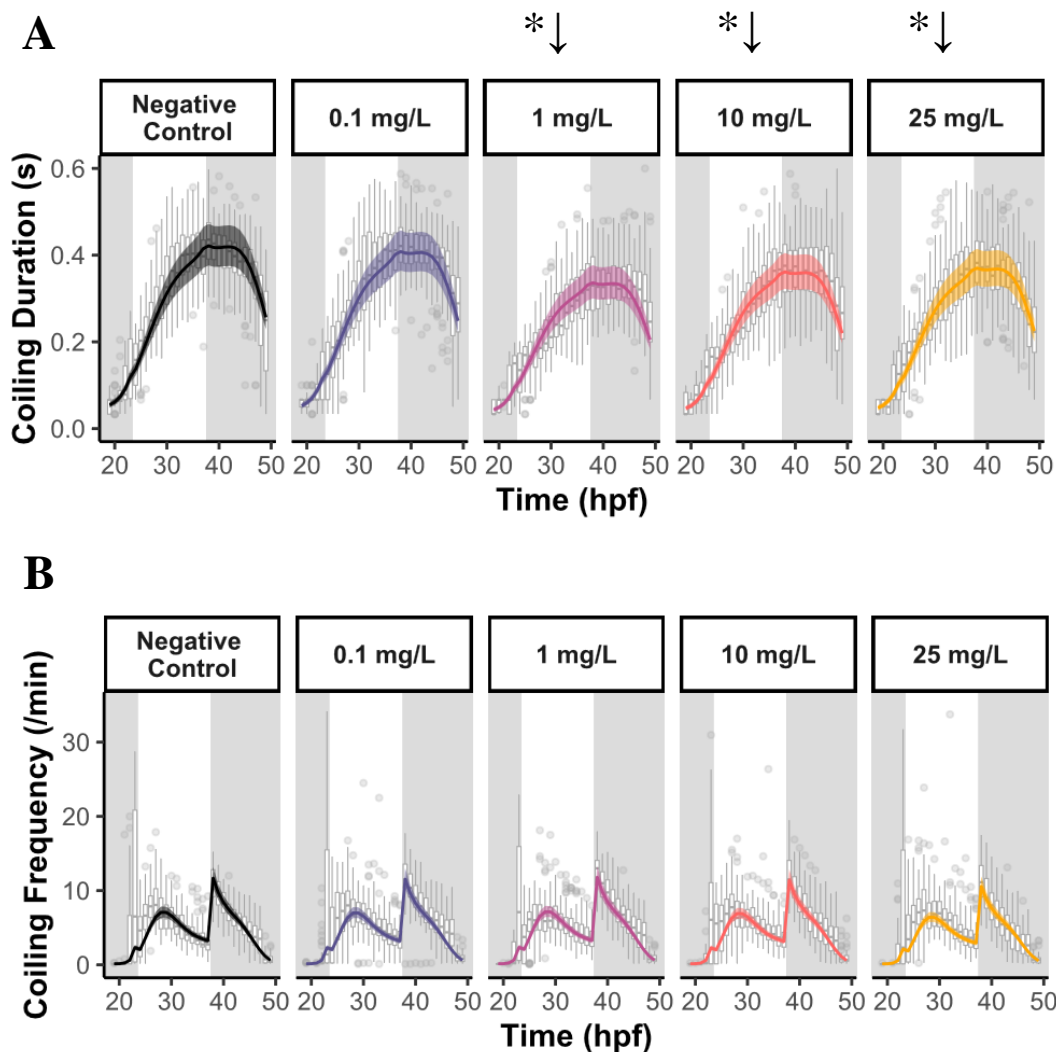


Abb. 2: Veränderungen im Coiling-Verhalten von 21 und 47 h alten Embryonen des Zebrafärblings (*Danio rerio*) nach Belastung mit Venlafaxin: (A) Coiling-Dauer; (B) Coiling-Frequenz (Boxplots aus 4 Replikaten à 3 Embryonen \pm 95 % Konfidenzintervalle). Dunkelphasen grau, Lichtphasen hell schattiert. * Signifikante Abweichungen von der jeweiligen Kontrolle (* $p < 0,01$); ↓ Hypoaktivität.

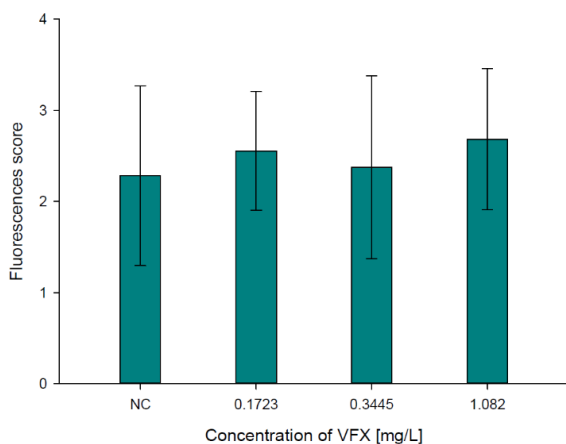


Abb. 3: Mittlerer Fluoreszenzwert von 9 ausgewählten Neuroanatomien im Seitenliniensystem von Embryonen des Zebrafärblings (*Danio rerio*) nach 96 h Belastung mit Venlafaxin (VFX). Daten als gemittelte Fluoreszenzwerte \pm Standardabweichung; n = 4 Replikate à 10 - 12 Embryonen

Diskussion

Sowohl der akute Fischembryotoxizitätstest als auch der Coiling-Assay ergaben ab 1 mg/L Venlafaxin signifikante Effekte, während beim Neuromasten-Assay keine Veränderungen beobachtet wurden. Demnach scheinen weder die im FET beobachteten Gleichgewichtsstörungen noch die Hypoaktivität im Coiling-Assay mit Veränderungen des Seitenlinienorgans in Verbindung zu stehen. In Anbetracht eines niedrigen Biokoncentrationsfaktors (18; Lajeunesse et al., 2011), welcher gemäß dem Schwellenwert für die Bedenklichkeit von persistenten, bioakkumulierbaren und toxischen Stoffen (PBT) in der Europäischen Union (BCF > 2000; ECHA, 2017) als nicht kritische Akkumulationsrate gilt, ergibt sich für eine Wirkkonzentration von 1 mg/L eine zunächst geringe Umweltrelevanz. Jedoch wurden bereits nach 48 h im Coiling-Assay Verhaltensveränderungen bei morphologisch normal entwickelten Embryonen beobachtet und auch Expositionen gegenüber anderen Antidepressiva wie Sertralin und Paroxetin

zeigten signifikante Veränderungen im Verhalten von Embryonen des Zebrafärblings ab 0,1 µg/L bzw. 0,01 µg/L (Fischer 2024), also bei durchaus umweltrelevanten Konzentrationen. Ein anderer Verhaltenstest, der Visual Motor Response-Assay (von Hellfeld et al. 2022; Zindler et al. 2020), ergab ebenfalls eine signifikante Reduktion des Schwimmverhaltens von 107 - 109 h alten Embryonen des Zebrafärblings ab 10 mg/L Venlafaxin bzw. 100 µg/L Paroxetin und 0,1 µg/L Sertralin (Fischer 2024).

Die Wirkschwelle für Venlafaxin liegt im Vergleich zu Paroxetin und Sertralin zwar signifikant höher, jedoch gelten die genannten Wirkschwellen nur für die Einzelsubstanzen; Kombinationswirkungen für Antidepressiva sind jedoch durchaus denkbar (Alfakeer et al. 2024; Bisesi et al. 2016; Varano et al., 2017). Allen voran steht hierbei Mirtazapin, welches zwischen 2012 und 2022 mit Venlafaxin zu den drei meistverschriebenen Wirkstoffen zur Behandlung von Depressionen in Deutschland gehörte (Statista 2024) und in Kombination mit Venlafaxin eine deutlich stärkere Wirkung entfaltet, weshalb es vor allem in den USA als California Rocket Fuel bezeichnet wird (Silva et al., 2016).

Förderung

Das EU-weite Projekt PHARMASEA wurde im Rahmen der Aquatic Pollutants-Initiative nach transnationaler Ausschreibung von Water JPI vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) unter der Nummer 724-40003-03F0906A finanziell unterstützt.

Literatur

- Alfakeer M, Rub MA, Azum N et al. (2024) Interaction of antidepressant drug with surfactant mixture in various compositions: effect of electrolyte and urea. Chem. Pap., 78, 23–34. DOI: 10.1007/s11696-023-03252-x
- Bisesi JH Jr, Sweet LE, van den Hurk P, Klaine SJ. (2016) Effects of an antidepressant mixture on the brain serotonin and predation behavior of hybrid striped bass. Environ. Toxicol. Chem., 35(4):938-45. DOI: 10.1002/etc.3114.
- Brustein E, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Drapeau P (2003) Steps during the development of the zebrafish locomotor network. J. Physiol. Paris, 97, 77-86. DOI: 10.1016/j.jphysparis.2003.10.009
- Drapeau P, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Brustein E (2002) Development of the locomotor network in zebrafish. Prog. Neurobiol., 68, 85-111. DOI: 10.1016/s0301-0082(02)00075-8
- DocCheck (2025) California Rocket Fuel. https://flexikon.doccheck.com/de/California_Rocket_Fuel; Aufgerufen: 12.11.2025
- ECHA 2017. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment, Chapter R.11: PBT/vPvB Assessment.
- EU (2010) Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection

of animals used for scientific purposes.

OJ L 276, 20.10.2010, pp. 33–79.

- Fischer M (2024) Impact of neurotoxic substances on the development and behavior of zebrafish embryos. Case studies with nicotine, desnitro-imidacloprid and three antidepressants. Dissertation: <https://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/34971/>.
- Fischer M, Wolf R, Hannemann R, Braunbeck T (2025) Generalized additive modeling as a tool for the analysis of the time course of tail coiling behavior in zebrafish (*Danio rerio*) embryos – A proof-of-concept study with nicotine, a known developmental neurotoxicant. Aquat. Toxicol., 284, 107373. DOI: 10.1016/j.aquatox.2025.107373
- Gould SL, Winter MJ, Norton WHJ, Tyler CR (2021) The potential for adverse effects in fish exposed to antidepressants in the aquatic environment. Environ. Sci. Technol., 55, 16299-16312. DOI: 10.1021/acs.est.1c04724
- Kimmel C B, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn., 203, 253-310. DOI: 10.1002/aja.1002030302
- Lajeunesse A, Gagnon C, Gagné F, et al. (2011) Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – Evidence of biological effects. Chemosphere, 83, 564-571. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.12.026
- Mezzelani M, Gorbi S, Regoli F (2018) Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. Mar. Environ. Res., 140, 41-60. DOI: 10.1016/j.marenvres.2018.05.001
- Nagel R (2002) DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. Altex 19 Suppl 1:38-48.
- Saint-Amant L, Drapeau P (1998) Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. J. Neurosci., 37, 622-32. DOI: 10.1002/(sici)1097-4695(199812)37:4<622::aid-neu10>3.0.co;2-s
- Sehonova P, Svobodova Z, Dolezelova P, Vosmerova P, Faggio C (2018) Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review. Sci. Total Environ., 631-632, 789-794. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.076
- Silva J, Mota J, Azevedo P (2016) California rocket fuel: And what about being a first line treatment? Eur. Psychiatry, 33, Supplement, S551. DOI: 10.1016/j.eurpsy.2016.01.2033
- Statista (2024) Wie viele Antidepressiva werden verschrieben? [https://de.statista.com/infografik/16707/verordnungen-von-antidepressiva-in-deutschland/#:~:text=Am%20meisten%20werden%20laut%20Arzneimittel,79%2C9%20Millionen%20Tagesdosen](https://de.statista.com/infografik/16707/verordnungen-von-antidepressiva-in-deutschland/#:~:text=Am%20meisten%20werden%20laut%20Arzneimittel,79%2C9%20Millionen%20Tagesdosen;); Aufgerufen: 12.11.2025
- Statista (2025) Prävalenz von Depression in ausgewählten OECD-Ländern in den Jahren 2019 bis 2022. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1424848/>

[umfrage/depression-und-depressive-symptomatik-nach-oecd-laendern/](#) ; Aufgerufen: 12.11.2025

- Stengel D, Zindler F, Braunbeck T (2017) An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Comp. Biochem. Physiol. C -Toxicol., 193:18-29. DOI: 10.1016/j.cbpc.2016.11.001
- Strähle U, Scholz S, Geisler R et al. (2012) Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments - a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. Reprod Toxicol., 33:128-132. DOI: 10.1016/j.reprotox.2011.06.121
- OECD (2013) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 236: Fisch Embryo Acute Toxicity (FET)Test. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- Varano V, Fabbri E, Pasteris A (2017) Assessing the environmental hazard of individual and combined pharmaceuticals: acute and chronic toxicity of fluoxetine and propranolol in the crustacean *Daphnia magna*. Ecotoxicol., 26(6):711-728. DOI: 10.1007/s10646-017-1803-6.
- von Hellfeld R, Brotzmann K, Baumann L et al. (2020) Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Environ. Sci. Eur. 32:122. DOI: 10.1186/s12302-020-00398-3
- von Hellfeld R, Ovcharova V, Bevan S et al. (2022) Zebrafish embryo neonicotinoid developmental neurotoxicity in the FET test and behavioral assays. Altex - Alternatives to Animal Experimentation, 39, 367-387. DOI: 10.14573/altex.2111021
- von Hellfeld R., Gade C., Baumann L. et al. (2023) The sensitivity of the zebrafish embryo coiling assay for the detection of neurotoxicity by compounds with diverse modes of action. Environ. Sci. Pollut. Res., 30, 75281–75299. DOI: 10.1007/s11356-023-27662-2
- Wang W, Zhang J, Hu M et al. (2023) Antidepressants in wastewater treatment plants: Occurrence, transformation and acute toxicity evaluation. Sci. Total Environ., 903, 166120. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.166120
- Wilkinson JL, Boxall ABA, Kolpin DW et al. (2022) Pharmaceutical pollution of the world's rivers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 119. DOI: 10.1073/pnas.2113947119
- Yin JH, Horzmann KA (2024) Embryonic zebrafish as a model for investigating the interaction between environmental pollutants and neurodegenerative disorders. Biomedicines, 13;12(7):1559. DOI: 10.3390/biomedicines12071559.
- Zindler et al. Time-course of coiling activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to ethanol as an endpoint for developmental neurotoxicity (DNT) - Hidden potential and underestimated challenges. Chemosphere, 235, 12-20. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.154

Zindler et al.: Do environmentally relevant concentrations of fluoxetine and citalopram impair stress-related behavior in zebrafish (*Danio rerio*) embryos? Chemosphere 261:127753. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127753

Korrespondenzadresse

Dr. Katharina Brotzmann
Centre for Organsimal Studies (COS)
Im Neuenheimer Feld 230
69120 Heidelberg
Brotzmann@uni-heidelberg.de