

BTO 2020.035 | Juni 2020

BTO rapport

Bioassays voor neuroactieve stoffen in
water

Bioassays voor neuroactieve stoffen in water

BTO 2020.035 | Juni 2020

Opdrachtnummer

402045/048/005

Projectmanager

Patrick Bäuerlein

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Chemische veiligheid

Auteur(s)

Astrid Reus, Tessa Pronk, Milou Dingemans
Met bijdragen van Jessica Legradi (VU), Harm
Heusinkveld (RIVM), Nynke Kramer (UU), Remco
Westerink (UU), Ron van der Oost (Waternet) en Tineke
van der Velden-Slootweg (HWL)

Kwaliteitsborger(s)

Thomas ter Laak

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Keywords

bioassays, neurotoxiciteit, zebraavis, waterkwaliteit

Jaar van publicatie
2020

Meer informatie
Milou Dingemans
T +31 (0)30 606 9505
E Milou.Dingemans@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

KWR

Mei 2020 ©

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevens bestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

BTO Managementsamenvatting

Bioassays bieden watersector mogelijkheden voor onderzoek naar neurotoxiciteit in waterkwaliteitsmonitoring

Auteur(s) Astrid Reus MSc, dr.ir. Tessa Pronk, dr. Milou Dingemans

Met bijdragen van dr. Jessica Legradi (VU), dr. Harm Heusinkveld (RIVM), dr. Nynke Kramer (UU) en dr. Remco Westerink (UU).

In het aquatisch milieu worden steeds meer stoffen gevonden die nadelige effecten kunnen hebben op het zenuwstelsel. Toch worden er nauwelijks testen toegepast voor effectmetingen van de chemische waterkwaliteit op het gebied van neurotoxiciteit. Deze studie laat op grond van verkennend onderzoek zien dat in principe voor de watersector neurotoxiciteitstesten beschikbaar zijn. Deze testmethoden maken gebruik van menselijke of dierlijke zenuwcellen en modelorganismen (bioassays). Welke modellen en technieken het meest geschikt zijn voor toepassing, moet verder worden onderzocht. Aanbevolen wordt om de ontwikkelingen op het gebied van bioassays voor neuroactieve stoffen nauwlettend te volgen. Deze kennis draagt bij aan toekomstige implementatie van neurotoxiciteitstesten voor waterkwaliteitsmonitoring.

Belang: aanwezigheid van neuroactieve stoffen in water vraagt om effectgerichte testmethoden

In het aquatisch milieu worden stoffen gevonden met mogelijk nadelige effecten op het zenuwstelsel. Om de aanwezigheid van dergelijke stoffen aan te tonen en de eventuele nadelige gezondheidseffecten te kunnen duiden, zijn veel ontwikkelingen gaande rondom testmethoden (zgn. bioassays) die gebruik maken van menselijke of dierlijke zenuwcellen en modelorganismen. Ondanks het feit dat er steeds meer neuroactieve stoffen in het aquatisch milieu worden aangetroffen, zijn worden testen voor effectmetingen van de chemische waterkwaliteit op het gebied van neurotoxiciteit nauwelijks toegepast.

Aanpak: samenvatten van nationaal onderzoek en relevante literatuur over neurotoxiciteitstesten

Wanneer het zenuwstelsel als gevolg van blootstelling aan stoffen – bijvoorbeeld via voeding of milieu – op enige manier verandert, is er sprake van neurotoxiciteit. Vooral tijdens de (vroeg) ontwikkeling zijn mens en dier hiervoor gevoelig.

Om te onderzoeken in welke mate testmethoden die de mogelijke nadelige effecten van stoffen op het zenuwstelsel kunnen monitoren beschikbaar en toepasbaar zijn voor de watersector, is een samenvatting gemaakt van nationaal onderzoek en relevante literatuur.

Resultaten: verschillende methoden zijn beschikbaar en toepasbaar voor de watersector

Dit rapport beschrijft de resultaten van een verkennend onderzoek naar de beschikbaarheid en geschiktheid van neurotoxiciteitstesten voor de Nederlandse en Vlaamse watersector. Daartoe is contact gelegd met academische groepen en onderzoeksinstituten in Nederland op het gebied van neurotoxiciteit en/of effectmetingen van de waterkwaliteit. Ook geeft het een schets van relevante ontwikkelingen hierover in Europese onderzoeksprojecten.

De conclusie luidt dat voor de watersector *in vitro* neurotoxiciteitstesten en testen met alternatieve organismen beschikbaar zijn. Welke modellen en technieken nu en in de toekomst het meest in aanmerking komen voor toepassing, moet nog verder worden onderzocht. Reden hiervoor is dat neurotoxiciteit een complex toxicologisch eindpunt is en moeilijk in te schatten valt met één simpele bioassay. Wel bestaan er bioassays die het effect van microverontreinigingen vanuit meerdere relevante mechanismen testen. Om de waarschijnlijkheid van het optreden van nadelige gezondheidseffecten te kunnen inschatten, kan het uitkomst bieden gebruik te maken van een getrapte teststrategie, waarin verschillende methoden met elkaar worden gecombineerd. Binnen de wet- en regelgeving voor de toelating van stoffen voor chemische, farmaceutische en voedingsindustrie zijn veel ontwikkelingen gaande rond het toepassen van *in vitro* testen en testen in alternatieve organismen voor neurotoxiciteit. Tegelijkertijd zijn er op dit gebied ontwikkelingen gaande in relatie tot waterkwaliteitsmonitoring. Aanbevolen wordt om deze ontwikkelingen te blijven volgen.

Toepassing: Implementatie van neurotoxiciteitstesten in de watersector op langere termijn

Voortgaand op het literatuuronderzoek dat in dit rapport is beschreven, kan verder worden ingezoomd op verschillende modellen en technieken. Te denken valt aan het bepalen van een beoogd eindpunt/werkingsmechanisme, de noodzaak voor specifieke expertise of apparatuur, kosten en doorlooptijd. Kennis over deze eigenschappen draagt bij aan het ontwikkelen van een strategie en het implementeren van neurotoxiciteitstesten in waterkwaliteitsmonitoring.

Het Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Bioassays voor neuroactieve stoffen* (BTO-###).

Samenvatting

Wanneer het functioneren van het zenuwstelsel als gevolg van blootstelling aan stoffen – bijvoorbeeld via voeding of milieu – op enige manier verandert, is er sprake van neurotoxiciteit. Vooral tijdens de (vroeg) ontwikkeling zijn mens en dier hiervoor gevoelig.

Omdat het zenuwstelsel een complex orgaansysteem is met vele mogelijke aangrijpingspunten voor nadelige effecten van stoffen, zijn er veel ontwikkelingen gaande op het gebied van *in vitro* testen voor neurotoxiciteit. Deze modelsystemen kunnen bestaan uit zenuwcellen van dieren of mensen van verschillende oorsprong (cellijnen, stamcellen, primair weefsel). Daarnaast worden er modelorganismen gebruikt, zoals zebravissen of nematoden.

Ondanks het feit dat er steeds meer neurotoxische en neuroactieve stoffen in het aquatisch milieu worden aangetroffen, worden er nauwelijks testen voor effectmetingen van de chemische waterkwaliteit op het gebied van neurotoxiciteit toegepast. In dit rapport is het resultaat beschreven van een verkenning ten aanzien van de beschikbaarheid en toepasbaarheid van dergelijke testen voor de Nederlandse en Vlaamse watersector. Daartoe is contact gelegd met academische groepen en onderzoeksinstituten in Nederland op het gebied van neurotoxiciteit en/of effectmetingen van de waterkwaliteit. Ook geeft het een schets van relevante ontwikkelingen hierover in Europese onderzoeksprojecten.

De conclusie luidt dat voor de watersector *in vitro* neurotoxiciteitstesten en testen met alternatieve organismen beschikbaar zijn. Welke modellen en technieken het meest in aanmerking komen voor toepassing, moet op basis van de aanknopingspunten uit dit verkennend onderzoek nog verder worden onderzocht. Reden hiervoor is dat neurotoxiciteit een complex toxicologisch eindpunt is en moeilijk in te schatten valt met één simpele bioassay. Wel bestaan er bioassays die het effect van microverontreinigingen vanuit meerdere relevante mechanismen testen. Om de waarschijnlijkheid van het optreden van nadelige gezondheidseffecten te kunnen inschatten, kan het uitkomst bieden gebruik te maken van een getrapte teststrategie, waarin verschillende methoden met elkaar worden gecombineerd. Binnen de wet- en regelgeving voor de toelating van stoffen voor chemische, farmaceutische en voedingsindustrie zijn veel ontwikkelingen gaande rond het toepassen van *in vitro* testen en testen in alternatieve organismen voor neurotoxiciteit. Tegelijkertijd zijn er op dit gebied ontwikkelingen gaande in relatie tot waterkwaliteitsmonitoring. Het wordt aanbevolen om deze ontwikkelingen te blijven volgen. In een vervolg op het literatuuronderzoek beschreven in dit rapport, kan er verder worden ingezoomd op verschillende modellen en technieken, bijvoorbeeld door het bepalen van een beoogd eindpunt/werkingsmechanisme, de noodzaak voor specifieke expertise of apparatuur, kosten en doorlooptijd. Kennis over deze eigenschappen draagt bij aan het ontwikkelen van een strategie en het implementeren van neurotoxiciteitstesten voor watermonsters.

Inhoud

<i>BTO Managementsamenvatting</i>	3
Samenvatting	5
Inhoud6	
1 Inleiding	7
2 Neurofysiologie	8
3 Neurotoxiciteitstesten	10
3.1 <i>In vitro</i> neurotoxiciteitstesten	11
3.2 Neurotoxiciteit in alternatieve modelorganismen	16
3.3 ‘Omics’ methoden	18
3.4 Onderzoek in Nederland	19
3.4.1 Voorbeeldstudie 1 (VU Environment & Health)	20
3.4.2 Voorbeeldstudie 2 (RIVM)	23
3.4.3 Voorbeeldstudie 3 (Neurotoxicology Research Group, Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS))	26
3.5 Onderzoek internationaal	29
4 Conclusie en aanbevelingen	32
5 Referenties	34

1 Inleiding

Wanneer het functioneren van het zenuwstelsel als gevolg van blootstelling aan stoffen – bijvoorbeeld via voeding of milieu – op enige manier verandert, is er sprake van neurotoxiciteit. Vooral tijdens de (vroeg) ontwikkeling zijn mens en dier hiervoor gevoelig (Gezondheidsraad, 2014; Rice and Barone, 2000). Mogelijk nadelige effecten van blootstelling aan stoffen op het ontwikkelende en volwassen zenuwstelsel kunnen op verschillende niveaus worden onderzocht. Basale en specifieke cellulaire en moleculaire functies worden bijvoorbeeld bestudeerd in de neurochemie en neurofysiologie, effecten op de structuur van zenuwen en het brein met neuro-imaging en neuropathologie en effecten op structuur en functie van het zenuwstelsel die invloed kunnen hebben op het gedrag en cognitieve vaardigheden worden onderzocht in gedragsstudies met proefdieren en in de mens (epidemiologie) (Casarett and Doull 2008).

Er is geen wettelijke verplichting om mogelijke nadelige effecten van alle gewasbeschermingsmiddelen en andere chemische stoffen op het zenuwstelsel te testen. Het al dan niet uitvoeren van onderzoek naar mogelijke neurotoxiciteit van dergelijke stoffen is afhankelijk van waargenomen effecten in langdurende toxiciteit studies met proefdieren, kennis over een bekend neurotoxisch werkingsmechanisme, een **relevante structuur-activiteit alert** van de stof (Bal-Price et al., 2000) en de hoeveelheid die van de stof wordt ingevoerd of vervaardigd (EG 1907/2006).

Van sommige gewasbeschermingsmiddelen, geneesmiddelen en illegale genotsmiddelen is bekend dat deze de zenuwfunctie kunnen beïnvloeden (Dingemans et al. 2016; Hondebrink et al. 2018; De Leeuw et al. 2019). Door gebruik en lozingen dergelijke stoffen aanwezig in Nederlandse en Vlaamse waterlichamen (Kools et al. 2019). Aangezien ongeveer veertig procent van het Nederlandse drinkwater en ongeveer vijftig procent van het Vlaamse drinkwater wordt gemaakt van (geïnfiltreerd) oppervlaktewater, is kennis over de aanwezigheid van mogelijk nadelige effecten van neuroactieve stoffen in het aquatisch milieu essentieel en is neurotoxiciteit een relevant toxicologisch eindpunt voor de chemische waterkwaliteit. Relevante effectmetingen kunnen worden toegevoegd aan een teststrategie voor waterkwaliteit, zoals bijvoorbeeld de Smart Integrated Monitoring (SIMONI) strategie voor het bepalen van de kwaliteit van oppervlaktewater (Van der Oost et al., 2017).

Er zijn veel verschillende modelsystemen beschikbaar waarin neurotoxiciteit kan worden gemeten, variërend van moleculen (bv. enzymen) en cellen tot intacte modelorganismen zoals nematoden (*Caenorhabditis elegans*) en zebrafissen (*Danio rerio*). Ook op het gebied van *in vitro* bioassays voor neurotoxiciteit, waarbij gebruik wordt gemaakt van menselijke of dierlijke zenuwcellen, zijn veel ontwikkelingen. Het voordeel van het gebruik van primaire zenuwcellen is dat hierin gevoelige effecten op specifieke zenuwfuncties kunnen worden gemeten, bijvoorbeeld met behulp van **micro-electrode arrays** (MEA) (Dingemans et al., 2016). In tegenstelling tot modelorganismen, zijn *in vitro* modellen niet bruikbaar voor onderzoek naar zichtbare effecten zoals ontwikkelingstoxicologie en gedragsstudies.

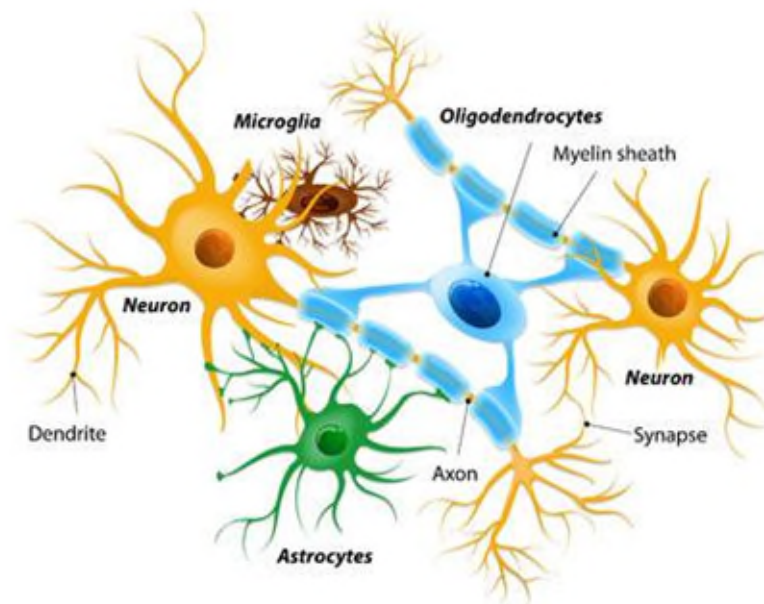
Structuur alerts geven informatie van een stof over de samenstelling van moleculen of de aanwezigheid van reactieve groepen die gerelateerd zijn aan toxicologische eigenschappen en het werkingsmechanisme van de stof.

Micro-elektrode arrays bestaan uit cellen die gekweekt worden op een fundament van geïntegreerde reeksen micro-elektroden (zgn. neuronale netwerken). De neuronale activiteit wordt bestudeerd door het meten van lokale veldpotentialen (pieken) (Bal-Price et al. 2018; Dingemans et al. 2016). Micro-elektrode arrays staan ook bekend als multi-elektrode arrays.

2 Neurofysiologie

Om na te gaan welke testmethoden geschikt zijn om neurotoxiciteit te onderzoeken, is het noodzakelijk om kennis te hebben van welke cellen hierbij betrokken zijn, wat de functie van deze cellen is en hoe verschillende processen in het zenuwstelsel verlopen.

Het zenuwstelsel bestaat uit het centrale zenuwstelsel, dat de hersenen en het ruggenmerg omvat, en het perifere zenuwstelsel met zenuwen, zenuwknoten (ganglia) en netwerken van zenuwen (plexussen). Het zenuwstelsel bestaat in de basis uit twee typen cellen, te weten neuronen en ondersteunende cellen. Figuur 1 geeft een schematische weergave van verschillende typen zenuwcellen.



Figuur 1. Schematische weergave van de verschillende celtypen in het zenuwstelsel (Afbeelding overgenomen van <https://www.sciencenewsforstudents.org/article/scientists-say-glia>)

Neuronen zijn functionele cellen van het zenuwstelsel die gespecialiseerd zijn in het doorgeven van reacties op fysische en chemische stimuli. Neuronen geleiden elektrochemische pulsen en scheiden chemische signaalstoffen (neurotransmitters) uit. Door deze eigenschappen zijn neuronen betrokken bij waarneming, leervermogen, geheugen en de controle van spieren en klieren. Hoewel neuronen in grootte en vorm variëren, bestaan ze uit drie onderdelen: een cellichaam (perikaryon), zenuwceluitlopers (dendrieten) en axonen. De functionele verbinding tussen een zenuwcel en een andere (zenuw)cel wordt een synaps genoemd (Fox 2002).

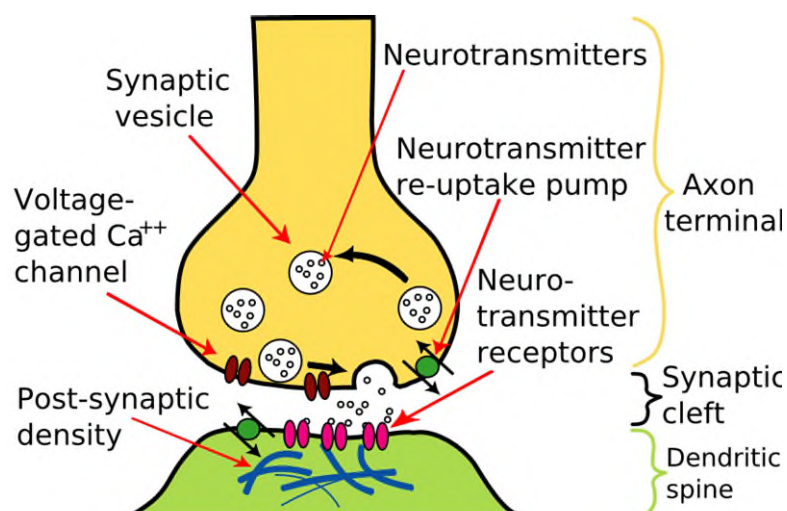
Het cellichaam is het vergrote deel van het neuron dat de celkern bevat. Vaak vormen meerdere neuronen clusters, de zgn. zenuwknoten. Dendrieten zijn dunne, vertakte structuren die uitlopen vanaf het celplasma van het cellichaam. Ze vormen een oppervlak dat prikkels ontvangt en elektrische impulsen doorgeeft aan het cellichaam. Een axon is een langere structuur die impulsen wegleidt van het cellichaam. Axonen variëren in lengte van enkele millimeters tot meer dan een meter (bv. die in het centrale zenuwstelsel naar de voeten) (Fox 2002).

Ondersteunende cellen zijn essentieel voor het goed functioneren van neuronen en zijn grofweg vijf keer meer aanwezig dan neuronen (Fox, 2002). Er zijn zes soorten ondersteunende cellen die zijn weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: Ondersteunende cellen in het zenuwstelsel en hun functies (Fox, 2002)

Celtype	Functie
Schwann cellen	Vormen myeline (<i>i.e.</i> een vetachtige stof) scheden rond perifere axonen, die als doel hebben zenuwimpuls sneller door te kunnen sturen
Satteliet cellen	Ondersteunen cellichamen in zenuwknopen van het perifere zenuwstelsel
Oligodendrocyten	Vormen myeline scheden rond de axonen van het centrale zenuwstelsel
Microglia	Migreren door het centrale zenuwstelsel en ruimen lichaamsvreemd en afstervend materiaal op door deze te omsluiten (fagocytose)
Astrocyten	Helpen de externe omgeving van neuronen in het centrale zenuwstelsel te reguleren
Ependymale cellen	Vormen een laag om de holtes van de hersenen en ruggenmerg

Een neurotransmitter is een lichaamseigen chemische signaalstof die in synapsen vrijkomt bij de activatie (opening) van ionkanalen om zenuwimpuls over te dragen tussen neuronen in het zenuwstelsel of naar andere cellen. Er zijn verschillende neurotransmitters, bijvoorbeeld acetylcholine (ACh), welke voornamelijk impulsen van motorische zenuwcellen overbrengt op spiercellen (Fox, 2002). Een dergelijk proces is schematisch weergegeven in Figuur 2.



Figuur 2. Schematische weergave van de overdracht van zenuwimpuls tussen neuronen in een synaps (Nrets, 2008).

De binding tussen ACh en het ontvangende eiwit (*i.e.* de neurotransmitter-receptor) blijft maar heel kort bestaan. Het ACh-receptor complex wordt snel ontbonden, maar kan opnieuw gevormd worden zolang er vrije ACh beschikbaar is. Om de impuls te stoppen, wordt ACh geïnactiveerd door het enzym acetylcholine esterase (AChE), en opgeslagen in synaptische blaasjes. Andere neurotransmitters zijn dopamine, serotonine en norepinephrine (Fox, 2002). Voor alle hierboven beschreven deelprocessen in de neurotransmissie zijn gevallen bekend van remming of activatie ervan door blootstelling aan een chemische stof.

3 Neurotoxiciteitstesten

Het zenuwstelsel kent specifieke eigenschappen die impact hebben op toxiciteit. Dit komt doordat niet alle stoffen vanwege de bloed-hersenbarrière in gelijke mate het brein kunnen bereiken, hersenen en zenuwcellen veel lipiden (vetachtige stoffen) bevatten, het zenuwstelsel een grote hoeveelheid energie verbruikt, er specifieke communicatie is tussen cellen (neurotransmissie), de morfologie van zenuwcellen uniek is (met lange uitlopers) en de biochemie van (typen) zenuwcellen specifiek is (Schmidt et al., 2017).

Traditioneel wordt mogelijke (ontwikkelings)neurotoxiciteit binnen de chemische-, farmaceutische- en voedingsindustrie getest in *in vivo* experimenten met knaagdieren, omdat alternatieve methoden niet wettelijk geaccepteerd zijn. Drie voor wet- en regelgeving geaccepteerde *in vivo* testen zijn de OECD testrichtlijn 424 (Neurotoxicity Study in Rodents), OECD testrichtlijn 426 (Developmental Neurotoxicity Study) en de OECD testrichtlijn 443 (Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study). Hoewel *in vivo* studies op verschillende toxicologische eindpunten veelal nog het eerste uitgangspunt zijn, is er een duidelijke behoefte aan de ontwikkeling van alternatieve testmethoden, zowel voor neurotoxiciteit als voor *in vivo* studies in het algemeen. *In vivo* studies zijn tijdrovend en kostbaar, kennen ethische bezwaren (er zijn vaak veel dieren nodig) en de pathologische en gedragsparameters die in *in vivo* studies onderzocht worden geven geen kennis van het mechanisme van het onderliggende effect. Om deze redenen gaat er momenteel veel aandacht naar de ontwikkeling van alternatieve methoden voor mogelijke neurotoxicologische effecten.

Voor effectmetingen van de chemische waterkwaliteit worden specifieke werkingsmechanismen gemeten in *in vitro* testen (zoals reportergerenassays) en niet-specifieke effecten in kleine intacte organismen (niet-vertebraten zoals algen, watervlooien en visembryo's) (Dingemans et al., 2019). Mechanistische *in vitro* testen zijn over het algemeen en in praktische zin geschikter voor waterkwaliteitsmonitoring dan testen met intacte organismen. Deze *in vitro* testen kunnen effecten meten van stoffen op specifieke eindpunten in relatie tot complexe fysiologische processen (zenuwstelsel, immuunsysteem, voortplanting en ontwikkeling). Afhankelijk van de keuze van specifieke eindpunten worden andere effecten van stoffen (op andere specifieke mechanismen) niet gedetecteerd. Gebruik van intacte organismen in verschillende levensfasen, waaronder de vroege ontwikkeling, is daarom een mogelijke goede aanvulling op de specifieke bioassays. Door de complexiteit van dergelijke organismen zijn er veel mogelijke aangrijpingspunten voor chemische stoffen aanwezig. In onderzoek met mogelijk neuroactieve stoffen is van belang om te realiseren dat met het uitblijven van een effect in een specifieke assay of in een niet-vertebraat niet kan worden uitgesloten dat (ontwikkelings)neurotoxiciteit niet optreedt. Dit is omdat een specifiek cellulair effect een al dan niet een grote impact kan hebben in het intact organisme, afhankelijk van de mate én timing van blootstelling (Rice and Barone, 2000). De keuze van het model is daarom erg belangrijk voor de interpretatie van de resultaten (Heusinkveld en Westerink, 2017). Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen bioanalytische tools (*i.e.* bioassays om blootstelling in te schatten) en bioassays voor integrale risicobeoordeling (*i.e.* inschatten van nadelige gezondheidseffecten voor de mens). Dit is in lijn met de doeleinden waarvoor effectgerichte testen in de (nabije) toekomst kunnen worden ingezet in de Europese Water Framework Directive (WFD). Deze doeleinden zijn o.a. inzet als screening tools om de toxische druk en impact te beoordelen en bij te dragen aan prioriteren van vervolgonderzoek, 'early warning systems' voor generieke veranderingen in waterkwaliteit, bestuderen van mengseltoxiciteit en stoffen waarvan geen toxiciteitsgegevens zijn en ondersteuning van de standaard chemische en ecologische monitoring (Wernersson et al. 2015). In een verwacht rapport van de Working Group Chemicals in de Common Implementation Strategy is een zogenaamde 'Neurotoxicity Outlook' opgenomen, waarvan de belangrijkste boodschap is dat nieuwe testmethoden nodig zijn om neurotoxiciteit te kunnen ondervangen (CIS 2019).

Voor het bepalen van de waterkwaliteit is het essentieel dat een methode snel en kostenefficiënt is, geschikt is voor high-throughput en betrouwbare resultaten oplevert. In onderstaande paragrafen worden relevante *in vitro* neurotoxiciteitstesten, alternatieve modelorganismen en cellulaire en moleculaire technieken beschreven.

3.1 *In vitro* neurotoxiciteitstesten

In een recente publicatie is een overzicht gemaakt van mogelijke *in vitro* modellen voor neurotoxische effecten en effecten op de ontwikkeling van het zenuwstelsel (Schmidt et al. 2017) waarbij ook een analyse is gedaan van de doorlooptijd en capaciteit (throughput) (Tabel 2). Daarnaast is in dezelfde publicatie een overzicht gemaakt van de cellulaire en moleculaire technieken die toegepast kunnen worden op de *in vitro* modellen (Tabel 3). Publicaties die een dergelijk overzicht beschrijven zijn echter niet beperkt tot deze publicatie. Coecke et al. (2007) is hiervan een voorbeeld.

Tabel 2. Samenvatting van neurotoxiciteit testmodellen (overgenomen van Schmidt et al. 2017 en aangepast).

Modelsysteem	Voordelen	Nadelen	Toepasbaarheid in de watersector
Niet-humaan			
Primaire cellen (gedissocieerde hersencellen van knaagdierembryo's of pups)	Functionele neuronale netwerken binnen twee weken, heterogene celpopulatie (veel aangrijpingspunten aanwezig)	Heterogene celpopulatie (mogelijk veel variatie in respons), nieuwe dieren nodig voor elke celweek, arbeidsintensief	Ja, reproduceerbaar, voor specifieke vragen
Neuronale knaagdiercellijnen (bv. C17.2 muis geïmmortaliseerde neuronale stamcellijn, Neuro-2a muis neuroblastoom cellijn, PC12, IMA)	Geen dieren nodig, geschikt voor specifieke targets	Geïmmortaliseerde cellen of cellen afkomstig van tumoren, fysiologie niet humaan en kan veranderd zijn, beperkte relevantie, kunnen geen functioneel netwerk vormen	Ja, mogelijk voor screeningsdoeleinden
Muis embryonale stamcellen	Zelf-vernieuwend, meervoudig potent, 'gevalideerd' platform voor ontwikkelingsneurotoxiciteit	Niet-humane fysiologie, beperkte relevantie, relatief kostbaar	Ja, als geavanceerd model. Humane stamcellen hebben wetenschappelijk gezien de voorkeur, maar kennen teveel nadelen
Humaan			
Primaire neuronen	Kan gezien worden als gouden standaard (juiste soort, juiste orgaan)	Bepaalde beschikbaarheid	Nee, beperkte beschikbaarheid
Primaire astrocyten	Commercieel verkrijgbaar	Variabele kwaliteit en karakterisering	Ja, mogelijk voor screeningsdoeleinden
Geïmmortaliseerde cellijnen (bv. van menselijke middenhersenen (LUHMES))	Gemakkelijk te vermeerderen, gestandaardiseerde protocollen voor differentiatie tot neuronen, astrocyten en oligodendrocyten beschikbaar, geschikt voor specifieke targets	Fysiologie kan veranderd zijn door oncogen/telomerase overexpressie (processen betrokken bij celdeling), kunnen geen functioneel netwerk vormen	Ja, mogelijk voor screeningsdoeleinden

Tabel 2. Vervolg

Modelstelsysteem	Voordelen	Nadelen	Toepasbaarheid in de watersector
Humaan (vervolg)			
Cellijnen geïsoleerd van neoplasmen (bv. SH-SY5Y humane neuroblastoom cellijn)	Gemakkelijk te vermeerderen, kunnen tot een meer gedifferentieerd fenotype worden geïnduceerd, geschikt voor specifieke targets	Fysiologie kan veranderd zijn, veel genetische afwijkingen, beperkt geschikt voor functionele netwerken	Ja, mogelijk voor screeningsdoeleinden
Neuronale stamcellen	Overleven, migreren en differentiatie <i>in vitro</i> , commercieel verkrijgbaar, goed gekarakteriseerd, robuust	Ethische bezwaren, relatief kostbaar, onduidelijk in welke staat van ontwikkeling van het hersengebied de cellen zich bevinden, differentiatieprotocollen kunnen lang zijn	Nee, nadelen wegen te zwaar
Embryonale stamcellen (hESC)	Zelf-vernieuwend, meervoudig potent, kan complexe structuren vormen, protocollen voor differentiatie tot verschillende celtypen zijn vastgesteld, wordt een breed geaccepteerd alternatief van dierstudies voor ontwikkelingsneurotoxicologie	Ethische bezwaren, relatief kostbaar, differentiatieprotocollen kunnen lang zijn	Nee, nadelen wegen te zwaar
Geïnduceerde meervoudig potente stamcellen (hiPSC)	Zelf-vernieuwend, meervoudig potent, kan complexe structuren vormen, kan verschillende menselijke genetische achtergronden modelleren, protocollen voor differentiatie tot verschillende celtypen zijn vastgesteld	Relatief kostbaar, differentiatieprotocollen kunnen lang zijn, kan grote verschillen van cellijn tot cellijn vertonen vanwege variatie in de menselijke genetische achtergrond en immuuncellen	Nee, nadelen wegen te zwaar
Bloedhersenbarrière (BBB) modellen	Combinatie van relevante celtypen bv. microvasculaire endotheelcellen, astrocyten en pericyten, metingen van toxicokinetische parameters mogelijk, beoordelen van schade aan de bloedhersenbarrière	Vastgestelde georganiseerde 3D structuur nodig, geavanceerde analytische eindpunten nodig (geen high-throughput)	Nee, momenteel te kostbaar en onvoldoende high-throughput. Mogelijk wel geschikt voor vervolgonderzoek.
Organ-on-a-chip (3D)	Interactie van verschillende celtypen, 3D contactpunten, mogelijkheid om myelinisatie (<i>i.e.</i> de vorming van de vetachtige stof (myeline) om de zenuwuitlopers) en neurologische ontstekingen waar te nemen, mogelijkheid om de zelf-organisatie van het weefsel waar te nemen	Complexe analyse (geen high-throughput), kwaliteitscontrole lastig	Nee, momenteel te kostbaar en onvoldoende high-throughput. Mogelijk wel geschikt voor vervolgonderzoek.

Tabel 3. Samenvatting van cellulaire en moleculaire technieken die gebruikt kunnen worden in neurotoxiciteitstesten (overgenomen van Schmidt et al. 2017 en aangepast).

	Doorlopende meting	High-throughput	High-content informatie	Voordelen	Nadelen
Klassieke technieken (FACS, ICC, biochemie)	Nee	Nee	Gedeeltelijk	Veel gebruikt, geaccepteerd	Relatief kostbaar, arbeidsintensief, tijdrovend
Weerstandsmetingen (impedantie)	Ja	Ja	Nee	Goedkoop	Alleen aantal cellen kan direct worden gekwantificeerd
High-content imaging	Ja (met lage tijdsresolutie)	Beperkt	Ja	Veel cellulaire eigenschappen kunnen worden geanalyseerd	Veel gegevens, vergt specialistische data analyse
Fluorescentiespectroscopie	Ja	Ja	Nee	High-throughput mogelijk, specifiek voor algemene functionele mechanismen	Mogelijke interferentie tussen de fluorescerende indicator en teststoffen
Multichannel parallel microscopie cytometrie	Ja	Ja	Beperkt	Hoogste throughput van alle technieken	Dunne ID images kunnen niet-eenduidige resultaten opleveren
Transcriptomics (zie ook hoofdstuk 3.3 over functional –omics)	Nee	Ja	Ja	Vergelijking van het complete genoom mogelijk	Relatief kostbaar, expressiepatronen voor celtoxiciteit van verschillende cellijnen en medicijnklassen moeten nog worden gedefinieerd
Metabolomics (zie ook hoofdstuk 3.3 over functional –omics)	Nee	Ja	Ja	Vergelijking van het complete genoom mogelijk	Metaboloom patronen voor celtoxiciteit van verschillende cellijnen en medicijnklassen moeten nog worden gedefinieerd
Klassieke elektrofysiologie	Nee	Beperkt	Nee	Functionele, specifieke neurotoxiciteits eindpunten	Specialistische expertise nodig
Micro-electrode array systems	Ja	Ja	Nee	Meet effecten in functionele neuronale netwerken	Veel gegevens, vergt specialistische data analyse

FACS: fluorescence-activated cell sorting, ICC: immunocytochemistry.

In de publicatie van Schmidt et al. (2017) ligt de focus op het vergroten van de throughput voor het testen van veel verschillende individuele stoffen, niet op environmental monitoring. Het is daarom niet duidelijk of deze kandidaatbioassays en -technieken geschikt zijn voor waterkwaliteitsmonitoring. Daarnaast gaat het om technieken welke op verschillende soorten celmodellen zouden kunnen worden toegepast, waarbij nog onduidelijk is welk model dan het meest geschikt zou kunnen zijn voor waterkwaliteitsmonitoring. Als uitgangspunt zou een afweging kunnen worden gemaakt op basis van de kweekkosten en heterogeniteit (aanwezigheid van veel verschillende mogelijke aangrijpingspunten voor stoffen), en bekende effecten van waterrelevante stoffen. Een eerste inschatting voor de geschiktheid voor waterkwaliteitsmonitoring is weergegeven in de laatste kolom van Tabel 2. Op basis van de in Tabel 3 beschreven voor- en nadelen van beschikbare cellulaire en moleculaire technieken, lijken **weerstandsmetingen**, **fluorescentiespectroscopie**, **multichannel parallel microscopie cytometrie** en micro-electrode array het meest geschikt. Deze technieken hebben mogelijkheden voor high-throughput en zijn kosteneffectief. De andere technieken zijn meer geschikt voor (specialistisch) vervolgonderzoek, bv. met geavanceerde modellen.

Weerstands- of impedantiemetingen worden gebruikt om de weerstand van een materiaal te meten aan de hand van een elektrische prikkel. Dit kan ook worden toegepast om fysiologische veranderingen in biologische weefsels te meten (Freeborn 2018).

Fluorescentiespectroscopie is een techniek om biologische processen te visualiseren waarbij moleculaire fluorescente probes worden gebruikt die een specifiek molecuul (bv. een eiwit) herkennen en na opwekking door blootstelling aan licht van een bepaalde golflengte licht van een andere specifieke golflengte uitzenden (Ptaszek 2018).

Multichannel parallel microscopie cytometrie is een combinatie van flow cytometry (*i.e.* tellen en bestuderen van cellen in een vloeistof met behulp van een laser) en high-content screening gebaseerd op microscopie (Ehrlich et al. 2011).

Naar aanleiding van een workshop georganiseerd door de OECD/European Food Safety Authority (EFSA) en twee workshops van het International Stakeholder Network (ISTNET) voor ontwikkelingsneurotoxiciteitstesten is er een publicatie verschenen over een aantal *in vitro* testen die zich in een relatief ver stadium van ontwikkeling bevinden. Het lange termijn doel van deze bijeenkomsten was om een batterij aan testen voor neurotoxiciteit te definiëren binnen een wettelijk kader. Zo'n batterij zou relevante testen voor alle biologische routes, processen en domeinen betrokken in ontwikkelingsneurotoxiciteit moeten omvatten. Centraal staan hierin de cruciale processen (key events) en bekende negatieve uitkomst routes (adverse outcome pathways, AOP) (Bal-Price et al. 2018). De verschillende testen zijn samengevat in Tabel 4 met in de laatste kolom een inschatting met betrekking tot toepasbaarheid voor waterkwaliteitsmonitoring. De tabel laat zien dat nog niet alle modellen voldoende ontwikkeld zijn om toegepast te worden voor neurotoxiciteitsonderzoek. Ook geldt hier dat het publicaties die een dergelijk overzicht beschrijven niet beperkt zullen zijn tot deze publicatie. Voor voorbeelden van relevante AOP processen die relevant zijn voor het koppelen van blootstelling aan neuroactieve stoffen aan humane toxiciteit wordt verwezen naar Aschner et al. 2017.

Tabel 4. Overzicht van niveau van gereedheid van verschillende in vitro testen en één in vivo test voor ontwikkelingsneurotoxiciteit (overgenomen van Bal-Price et al., 2018 en aangepast).

Testmethode	Afkorting	Fase I: basiseigenschappen	Fase II: implementatie	Fase III: screening	Totaal	Toepasbaarheid voor de watersector
PSC differentiatie tot NPC/NSC embryonale fase differentiatie	UKN1	A	B	B	B+	Nee, humane stamcellen (zie Tabel 1)
hNPC proliferatie	NPC1	A	A	A	A	
hNPC migratie	NPC2	A	A	A	A	
hNPC neuronale differentiatie	NPC3	A	A	B	A-	
hNPC gedifferentieerde neuronen	NPC4	A	B	C	B	
hNPC oligodendrocyt differentiatie	NPC5	A	A	B	A-	
hNPC oligodendrocyt maturatie en TH verstoring	NPC6	A	B	B	B+	
NCC proliferatie en migratie	UKN2 (cMINC)	A	B	A	A-	
Morphologische ESC tot neuronen	MESn	C	D	D	D-	
Neuriet uitgroei van centrale neuronen	UKN4 (NeuriTox)	A	A	A	A	
Neuriet uitgroei perifere neuronen	UKN5 (PeriTox)	A	B	A	A-	
Neuronale subtype ratio, neuronale maturatie	NSR	C	D	D	D-	Ja, wanneer uitgevoerd in geschikt model (zie Tabel 1)
Synaptogenese	SYN	B	B	B	B	
Neuronaal netwerk vorming en functie	Nnff (=MEA)	B	A	B	B+	
Astrocyten, oligodendrocyten, myelinatie en microglia in 3D rat model	3Dr	A	A	A	A	Nee, geen high-throughput en dieren nodig
Astrocyten, oligodendrocyten, myelinatie en microglia in 3D humaan model	3Dh	B	C	C	C-	Nee, geen high-throughput
Zebrafish embryo's	ZFE	B	B	A	B+	Ja

Fase I: Basiseigenschappen van de testmethode na wetenschappelijk onderzoek, Fase II: Implementatie van de test voor praktische toepassingen in de industrie en/of wet- en regelgevingsdoeleinden, Fase III: Screening (optioneel). De scores varieerden van A (grotendeels gereed) tot B (nagenoeg gereed), C (beperkt gereed) en D (helemaal niet gereed). NPC/NSC: neuronale stamcellen, NCC: neuronale stamcellen die o.a. neuro-endocrine cellen genereren, PSC: potente stamcellen, UKN: serie testsystemen/methoden waarmee verschillende processen in de ontwikkeling van het zenuwstelsel kunnen worden onderzocht.

Organ-on-a-chip modellen hebben momenteel binnen de toxicologie veel aandacht. Bij organ-on-a-chip modellen is driedimensionaal weefsel bijeengebracht in een constructie met microvloeistofnetwerken om een model te verkrijgen dat representatief is voor de *in vivo* situatie. Het is mogelijk om verschillende organ-on-a-chip modellen aan elkaar te koppelen en een netwerk te creëren waarbij relaties tussen organen bestudeerd kunnen worden. Hoewel organ-on-a-chip modellen primair zijn ontwikkeld als alternatief voor de kostbare en langdurende *in vivo* studies voor stamcel- en kankeronderzoek en het testen van medicijnen, worden ze ook toegepast in de milieutoxicologie (Cho and Joon, 2017) en neurotoxiciteit (Yi et al., 2015). Verschillende technieken die *in vitro* of in alternatieve modelorganismen gebruikt worden om effecten op het zenuwstelsel te bepalen kunnen op deze organ-on-a-chip modellen worden toegepast. Koo et al. (2018) beschrijft bijvoorbeeld een model waarin gekeken werd naar effecten van op organofosfaat gebaseerde stoffen op de integriteit van de bloed-hersenbarrière, acetylcholinesterase inhibitie, viabiliteit en de hoeveelheid niet-opgenomen stof. Naast de vele voordelen kent het gebruik van organ-on-a-chip modellen ook nadelen, namelijk dat de analyses veelal complex zijn, er vooralsnog niet of nauwelijks high-throughput mogelijkheden zijn en de kwaliteitscontrole lastig is.

3.2 Neurotoxiciteit in alternatieve modelorganismen

Nematoden

De kleine, niet-ziekteverwekkende nematode *C. elegans* is een veel gebruikt experimenteel model dat een grote bijdrage heeft geleverd aan het begrijpen van veel menselijke ziekten. Het gebruik van *C. elegans* kent vele voordelen, waaronder het kleine formaat, de korte levenscyclus en de hoge voortplantingssnelheid. Hierdoor is het gebruik in een laboratorium relatief gemakkelijk en kostenefficiënt. Doordat de nematode transparant is en het gemakkelijk is om reportergenen te introduceren, kunnen celmorfologie en eiwitexpressie *in vivo* gevisualiseerd worden. Daarnaast is het genoom gemakkelijk te manipuleren waardoor genetische processen ook goed onderzocht kunnen worden (Ruszkiewicz et al., 2018).

C. elegans kan gebruikt worden om effecten van stoffen op het zenuwstelsel te meten (EFSA 2018). Er zijn bijvoorbeeld genetisch gemodificeerde stammen waarin (effecten van stoffen op) morfologie en functie van zenuwcellen kunnen worden gevolgd door middel van fluorescentie metingen. Wildtype stammen zouden ook kunnen worden gebruikt voor analyses van effecten van stoffen op gedrag en activiteit. Het review van Ruszkiewicz et al. (2018) vat een aantal case studies samen waarin *C. elegans* succesvol is gebruikt voor het neurotoxicologisch onderzoek naar o.a. mangaan, kwik, arseen, lood, fluoride en gewasbeschermingsmiddelen. Hieruit kan worden geconcludeerd *C. elegans* bruikbaar is als model om effecten van stoffen op het ontwikkelende zenuwstelsel te onderzoeken en kan bijdragen aan kennis omtrent de hierbij betrokken moleculaire mechanismen. Extrapolatie van resultaten naar mogelijk gezondheidseffecten in hogere organismen zoals de mens zou mogelijk moeten zijn, hoewel hier nog veel aanvullend onderzoek naar verschillen en overeenkomsten in kinetiek en fysiologie voor nodig is. Het gebruik van *C. elegans* kent ook beperkingen, zoals de afwezigheid van veel specifieke organen zoals nieren, lever, longen, huid en vaten. Zelfbevruchting en de schaarste aan mannetjes bemoeilijken het bestuderen van geslachtsverschillen, wat een voor ontwikkelingsneurotoxicologie relevant aspect is (Ruszkiewicz et al. 2018). Daarnaast is de blootstellingsroute een mogelijke beperking vanwege de goed beschermde huid van nematoden.

Zebravissen

De zebravis (Figuur 3) wordt in toenemende mate toegepast als modelorganisme omdat vanwege gelijkende (patho)(neuro)fysiologie in verschillende ontwikkelingsstadia toxicologische resultaten geëxtrapoleerd kunnen worden naar mens en dier. Praktische voordelen van het model zijn dat embryonale/juvenile groei snel gaat (korte levenscyclus), dat de zebravis zich gemakkelijk voortplant, dat embryo's doorzichtig zijn en tot 120 uur na bevruchting voor de wet niet als proefdier aangemerkt hoeven worden, waardoor er geen goedkeuring van een ethische commissie (DEC) nodig is. Omdat het model veelgebruikt is, is het biologisch goed gekarakteriseerd en zijn er veel (moleculaire) methodieken ontwikkeld, inclusief genetische modificatie.

De zebravis heeft een zenuwstelsel dat voor een groot gedeelte vergelijkbaar is met het zenuwstelsel van de mens. Ook al is de anatomie van het brein eenvoudiger, de belangrijkste neurotransmittersystemen die nodig zijn voor het functioneren van de mens komen ook in de zebravis tot expressie (Horzmann et al., 2016). Binnen vijf dagen ontwikkelt een bevruchte eicel zich tot een volledig functionerende vissenlarve waarvan het zenuwstelsel in staat is prikkels te ontvangen, te verwerken en hierop te reageren. Doordat de zebravis op deze leeftijd nog erg klein is, kan experimenteel werk high-throughput uitgevoerd worden. Omdat zebravissen over een lever en andere organen beschikken die absorptie, distributie, metabolisme en excretie beïnvloeden, worden deze processen meegenomen in de uiteindelijke blootstelling aan stoffen. Als het doel van een experiment is om humane gezondheidseffecten te bepalen, moet echter rekening worden gehouden met het feit dat de blootstellingsroute van vissen niet identiek is aan die van de mens.



Figuur 3. Lichtmicroscopisch beeld van een twee dagen oud (A) en drie dagen oud (B) zebravisembryo (VU-E&H).

Andere modelorganismen

De fruitvlieg *Drosophila melanogaster* was in de jaren tachtig en negentig hét model om (effecten van) veranderingen in het DNA (oftewel mutagenese) te bestuderen vanwege het gemak waarmee het genoom te manipuleren was. *Drosophila* is ook geschikt om ontwikkelings- en gedragstoxicologie te bestuderen. Het voordeel is dat ze goedkoop zijn, gemakkelijk te huisvesten, een relatief korte levenscyclus hebben die bestaat uit vier duidelijk verschillende stadia: embryo, larve, pop en volwassen vlieg. Elk van deze stadia biedt unieke mogelijkheden om gevoeligheid van stoffen op het zenuwstelsel te onderzoeken. Effecten van blootstelling aan stoffen kunnen worden gemeten o.a. met immunohistochemische kleuring, via reportergenen (zoals het groen fluorescerende eiwit GFP) aan een specifiek gen wat interessant is om te onderzoeken, fenotypische veranderingen en beweging (gedrag) (Rand, 2010).

Vanuit ecotoxicologie is het relevant om verschillende klassen van organismen (bv. algen/planten, insecten/kreeftachtigen, schaal- en schelpdieren en/of een gewervelde vis) gebruiken voor waterkwaliteitsmonitoring. Sommige organismen hebben zeer specifieke gevoeligheid voor neurotoxische stoffen. Naast de fruitvlieg zijn er in de literatuur nog andere modellen beschreven waar gedragsstudies mee gedaan zijn, waaronder schietmotten (*Hydropsyche angustipennis*), larven van vlokreeften (*Corophium volutator*), watervlooiën (*Daphnia magna*), kokkels, larven van dansmuggen (*Diamesa zernyi*), aardwormen (*Eisenia fetida*), mosselen (*Corbicula fluminea*) en groene algen (*Chlamydomonas reinhardtii*). Deze modellen zijn echter niet zo uitgebreid beschreven in de literatuur als de nematode en de zebravis en een verandering in gedrag hoeft niet noodzakelijkerwijs veroorzaakt te zijn door een neurotoxische stof. De genoemde organismen zijn echter in staat om zeer snel aspecifiek te reageren op de aanwezigheid van stoffen, wat een aanleiding kan zijn voor vervolgonderzoek. Een aantal van deze modellen wordt ook als zodanig toegepast door waterbeheerders en drinkwaterbedrijven als 'early warning systems' (Legradi et al. 2018).

Vroege ontwikkelingsstadia van de zee-egel vormen een representatief model om de mechanismen die ontwikkeling en differentiatie in hogere organismen aansturen te kunnen onderzoeken. De eigenschappen van de geslachtscellen van zee-egel en vroege embryo's maken het mogelijk om veranderingen waar te nemen zonder kostbare technieken omdat de eicellen relatief groot zijn (80-100 nm). Daarbij is het membraan rond de eicel transparant, waardoor de ontwikkeling goed zichtbaar is met een goede stereomicroscoop. Een aantal moleculen die specifiek betrokken zijn bij neurale en neuromusculaire systemen zijn aanwezig in cellen en weefsels tijdens specifieke stadia in de ontwikkeling van de zee-egel (Falugi et al. 2008). De zee-egel lijkt dus vooral relevant voor onderzoek naar ontwikkelingsneurotoxiciteit en wordt in een wetenschappelijk rapport van de EFSA genoemd in hetzelfde rijtje als de zebra-vis en nematode (Fritsche et al. 2015), maar in nationale en internationale initiatieven omtrent neurotoxiciteit komt dit modelorganisme echter niet terug.

3.3 'Omics' methoden

Veel van de effecten in de hierboven beschreven modelorganismen worden gemeten met visuele technieken. Echter, afwijkingen zijn niet altijd zichtbaar, dergelijke technieken zijn vaak niet high-throughput en ze vereisen vaak specialistische expertise. Chemische of biologische markers zoals toegepast in zogenaamde 'omics' technieken zijn doorgaans eenvoudiger te kwantificeren.

Bioassays die gebaseerd zijn op functionele omics technieken zijn een speciale groep van bioassays die inzicht kunnen geven in de cellulaire en moleculaire werkingsmechanismen van chemische stoffen of hun mengsels resulterend in fysiologische veranderingen (Kim et al, 2015; 2013; Taylor et al., 2010; Xia et al., 2017).

De functionele omics bioassays maken gebruik van het feit dat biologische organismen, zowel het hele organisme als organen en cellen, kunnen reageren bij blootstelling aan stoffen uit hun omgeving. Enerzijds kunnen schadelijke effecten van buitenaf actief worden tegengegaan, anderzijds kunnen bepaalde functies onbedoeld worden gehinderd. Dit brengt in veel gevallen een verandering mee in genen die tot expressie komen in het organisme (transcripten, die gemeten worden met transcriptomics), wat gevolgen heeft voor de eiwitten die gemaakt worden (zoals enzymen en andere grote eiwitmoleculen, gemeten met proteomics) en uiteindelijk de gevormde metabolieten (omzettingsproducten zoals hormonen en andere kleine moleculen die bv. een rol spelen bij signaaltransductie, gemeten met metabolomics). Welke transcripten, eiwitten, metabolieten precies gemaakt worden of juist niet, geven een aanwijzing over welke effecten er plaatsvinden en welk werkingsmechanisme er speelt (Berninger et al., 2014; Marinovic-Weigelt et al., 2014). Een voorbeeld is een studie waarin de effecten van hormoonachtige chemicaliën die het cholesterol en stereoïde metabolisme beïnvloeden werden vastgesteld via transcriptomics in vissenlevers, blootgesteld aan afvalwater (Marinovic-Weigelt et al., 2014).

Neurotoxiciteit wordt ook onderzocht met omics bioassays. Schmidt et al. (2017) concludeerde dat nog niet voor alle mogelijke cellijnen, organismen en soorten neurotoxiciteit de expressiepatronen zijn vastgesteld (zie Tabel 2). Dat betekent echter niet dat er nog niets bekend is. Er is namelijk al wel veel informatie over expressiepatronen in diverse organismen en cellen in reactie op specifieke neurotoxische stoffen. Dit onderzoek wordt voornamelijk gedaan vanuit de farmaceutische- of andere industrieën die celmodellen gebruiken voor het duiden en voorspellen van chemisch geïnduceerde neurotoxiciteit (Karri et al., 2018, Schultz et al., 2015; Shinde et al., 2017; Theunissen et al., 2012). Ook zijn er patronen vastgesteld vanuit de biomonitoring van effecten van specifiek neurotoxische stoffen met -omics technieken in beenvissen (Martyniuk et al., 2011; Liang en Zha, 2016). Meestal gebeurt het vaststellen van mogelijke neurotoxiciteit van een stof door deze met een specifieke dosis te testen en te vergelijken met al vastgestelde patronen van andere, individueel geteste neurotoxische referentiestoffen.

Het biomonitoren van waterkwaliteit met omics methoden specifiek met betrekking tot neurotoxiciteit is op zichzelf nog niet ver ontwikkeld. Hoewel chemische en biologische markers relatief eenvoudig te kwantificeren zijn, is net zoals bij andere technieken de interpretatie van relevante effecten van complexe mengsels in omics metingen voor de menselijke gezondheid en het milieu een grote uitdaging (Altenburger et al., 2012). Daarnaast is de keuze van het testsysteem belangrijk voor de interpretatie van de resultaten. Bij toepassing van omics technieken in *in vitro* bioassays is de uitkomst beperkter vergeleken met het gebruik van een organisme. Anderzijds kunnen resultaten verkregen van een bioassay met organismen te ingewikkeld zijn om een goede interpretatie te kunnen doen. Er is op dit moment nog geen standaard omics gebaseerd testsysteem (combinatie van een model en een methode) voor het duiden van onbekende en bekende mengsels van neurotoxische stoffen in water.

In ecotoxiciteitonderzoek worden functionele omics methoden wel onderzocht, bijvoorbeeld in onderzoek naar veranderingen in organismen zoals de watervlo (*D. magna*) (Kim et al., 2015; Soong et al., 2014; Taylor et al., 2010; Vanderbrouck et al., 2010), zebravis (*D. rerio*) (Raldúa et al., 2013), nematode (*C. elegans*) en celsystemen (Xia et al., 2017). De watervlo als model organisme is hierbij favoriet omdat dit het meest gebruikte proefdier is voor ecotoxicologisch onderzoek (Kim et al., 2015; Vandenbrouck et al., 2010). Deze omics testen zijn nog niet geschikt voor het vaststellen van de waterkwaliteit, maar geven een indruk van toxicologische mechanismen die een rol spelen na blootstelling aan stoffen in het betreffende water. De expressiepatronen zullen anders geïnterpreteerd moeten worden bij een beoordeling van de waterkwaliteit.

Het potentieel van het bepalen van waterkwaliteit met functionele omics bioassays is hoe dan ook groot. Omdat genen, proteïnen, metabolieten binnen enkele minuten tot uren gemaakt worden, zou al na een korte blootstelling inzicht kunnen worden verkregen in welke cellulaire mechanismen worden gestimuleerd of geremd (Soong et al., 2015). Xia et al. (2017) concludeerde dat een transcriptoomanalyse met *in vitro* humane cellen een efficiënte en mogelijk kostenbesparende manier zou kunnen zijn om (mengsels van) microverontreiniging te karakteriseren. Of het inderdaad een kostenbesparing oplevert, hangt af van met welke neurotoxiciteitstest de transcriptoomanalyse wordt vergeleken. Een omics bioassay kan in potentie veel informatie met betrekking tot herkenbare en specifieke expressiepatronen opleveren voor een brede selectie van neurotoxische stoffen (Vandenbrouck et al., 2010). Mogelijk kunnen neurotoxische stoffen die nu nog in meerdere verschillende bioassays getest worden in één functionele omics assay in een geschikt model tegelijkertijd gedetecteerd worden. Hierdoor kunnen in theorie mengsels van stoffen met verschillende werkingsmechanismen of met specifieke (neuro-)toxicologische eindpunten geïdentificeerd worden, wat een enorme efficiëntieslag zou opleveren. In de praktijk blijkt echter dat na blootstelling aan een complex mengsel veel specifieke effecten van stoffen worden gemaskeerd door andere stoffen. Verder onderzoek is nodig om te bepalen of visuele technieken en cellulaire/moleculaire technieken zoals omics elkaar kunnen versterken of vervangen.

3.4 Onderzoek in Nederland

In Nederland wordt op het gebied van neurotoxiciteit onderzoek gedaan met zebravissen bij de Vrije Universiteit Amsterdam (VU) en het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Daarnaast wordt bij het Institute for Risk Assessment (IRAS) van de Universiteit Utrecht (UU) in de Neurotoxicologie onderzoeksgroep onderzoek gedaan met veel verschillende modellen en methoden. De laatste ontwikkelingen en relevante resultaten zijn hieronder beschreven door de betrokken onderzoekers.

3.4.1 Voorbeeldstudie 1 (VU Environment & Health)

In de hier beschreven studie is de toepasbaarheid van transcriptomics in vergelijking en in combinatie met gedragstesten met zebravisembryo's (*D. rerio*) onderzocht voor watermonsters door de onderzoeksafdeling Environment and Health van de VU (VU-E&H, <https://science.vu.nl/en/research/environment-and-health/research-topics/mechanism-of-toxicity/index.aspx>). Een deel van het onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met Waternet (Dr. R. van der Oost) die extracten van passieve bemonstering (passive sampling) en groot-volume extractie watermonsters aanleverde. In het eerste deel van het onderzoek zijn veranderingen onderzocht in het transcriptoom na blootstelling aan zuivere stoffen (referentiestoffen) die regelmatig als verontreiniging in oppervlaktewater voorkomen. In de volgende stap zijn transcriptomics, ontwikkelings- en neurotoxiciteit onderzocht van verschillende extracten bij relevante concentraties. Als laatste stap is er een ringonderzoek georganiseerd binnen het NORMAN consortium, waarin twee pure stoffen en een gespiket waterextract [aangeleverd door het Helmholtz Center for Environmental Research (UFZ) in Duitsland]) zijn getest in zes verschillende onderzoeksgroepen met hun in-house zebravisembryo gedragsmethoden. Alle testen zijn uitgevoerd met zebravisembryo's jonger dan vijf dagen, dwz. voordat zij officieel als volwaardig proefdier worden beschouwd (alternatieve assay). Hieronder worden de resultaten van de drie fasen kort beschreven.

Fase 1: Referentiestoffen (Cypermethrin; Diclofenac; Ethinyl estradiol; Terc-octylphenol; Tributyltin hydride)

De transcriptoom analyse is gedaan met behulp van 42 genen die verschillende pathways omvatten (metabolisme (cytochrome P450s, (CYPs)), neuro-ontwikkeling en neurofunctionaliteit, immuunfunctionaliteit, oestrogeniteit, DNA onderhoud, oxidatieve stress en vetmetabolisme). Er wordt een nieuwe genetische score ontwikkeld om transcriptoom responsen van stoffen te kunnen vergelijken. Tijdens het onderzoek zijn twee verschillende blootstellingsscenario's onderzocht, *i.e.* een lange blootstelling van vijf dagen (dag nul tot dag vijf dag na bevruchting) en een korte blootstelling van één dag (dag vier tot dag vijf dag na bevruchting). Alle referentiestoffen lieten de verwachte respons zien. De korte blootstelling gaf een sterkere genetische respons in vergelijking met de lange blootstelling.

Fase 2: Waterextracten (passieve bemonstering en groot-volume extracten)

Een eerste set extracten (zes locaties, twee verschillende bemonsteringsmethoden) is gebruikt om de genetische score van Fase 1 verder te ontwikkelen. Zoals verwacht worden er verschillende effecten gezien met de verschillende passieve samples (Figuur 4). Met de tweede set extracten zijn veranderingen in het transcriptoom, de ontwikkeling en het gedrag onderzocht. Het laboratorium van de VU heeft een ruime ervaring in het toepassen van gedragstesten met zebravisembryo's. Voor dit onderzoek werd één van de vijf bij de VU beschikbare assays geselecteerd, de [Light-dark-transition test](#), met een systeem waarin gedrag automatisch wordt geregistreerd. Deze test was het meest responsief in een eerder uitgevoerde studie met meer dan veertig individuele stoffen. Van de veertien geteste silicone rubber (SR) extracten lieten drie monsters een verandering in gedrag zijn bij de hoogste testconcentraties. Van de dertien overeenkomstige (zelfde locatie) Polar Organic Chemical Integrative Samplers (POCIS) liet slechts één monster een verandering in gedrag zien, maar alle monsters vertoonden een hoge mate van ontwikkelingstoxiciteit wat leidde tot sterfte in de hoogste concentraties. De geteste concentraties waren echter variabel omdat ze niet waren gerelateerd aan de geëxtraheerde watervolumes van de passieve samplers. Daarom is in een volgend onderzoek voor elke locatie een concentratiefactor van 40x gebruikt.

	Pathway score								DarT Gene
	DNA damage	ER	Gen stress	Immunotox	Lipids	Metabo	Neurotox	Ox. Stress	
SR_1	0.10	3.21	0.03	0.11	0.02	0.11	0.23	0.03	0.48
SR_2	0.04	11.79	0.01	0.11	0.06	0.22	0.18	0.01	1.55
SR_3	0.10	4.17	0.00	0.15	0.12	0.66	0.08	0.04	0.66
SR_4	0.00	2.13	0.00	0.03	0.08	0.41	0.09	0.01	0.34
SR_5	0.02	9.81	0.02	0.25	0.07	2.51	0.20	0.02	1.61
SR_6	0.13	9.22	0.00	0.09	0.01	0.25	0.24	0.01	1.24
P_1	0.01	3.24	0.01	0.16	0.21	1.29	0.12	0.02	0.63
P_2	0.04	0.72	0.02	0.01	0.14	0.21	0.15	0.04	0.17
P_3	0.18	5.99	0.05	0.09	0.14	2.32	0.47	0.02	1.16
P_4	0.12	1.70	0.03	0.03	0.09	1.50	0.20	0.01	0.46
P_5	0.17	0.03	0.00	0.03	0.01	0.04	0.04	0.03	0.04
P_6	0.07	0.23	0.01	0.01	0.12	0.21	0.07	0.01	0.09

Figuur 4. Zebravisembryo's zijn behandeld met waterextracten van set 1, waarbij gebruik werd gemaakt van silicon rubbers (SR) of POCIS (P) als passieve samplers. Genetische scores van de blootgestelde embryo's zijn weergegeven. Rood geeft een sterke inductie van de AOP aan, groen geeft aan dat er geen effect was op de betreffende AOP. De oestrogene pathway wordt het meest geïnduceerd, gevolgd door metabolisme en neurotoxiciteit.

De passieve sampler extracten zijn getest bij dit concentratieniveau voor effecten op het transcriptoom, de ontwikkeling en het gedrag. Hierin zijn geen effecten op de ontwikkeling en het gedrag waargenomen, terwijl er wel significante veranderingen op transcriptoomniveau zijn waargenomen. Naast veranderingen in metabolisme (CYPs) en oestrogeniteit, waren er ook veranderingen in neurologische pathways zichtbaar. Het toepassen van een lange en korte blootstelling had geen effect op de waargenomen veranderingen in ontwikkeling en gedrag, maar de veranderingen in het transcriptoom waren sterker na korte blootstelling. De resultaten van deze fase tonen aan dat transcriptoomanalyse gevoeliger is dan gedragstesten. Effecten op het gedrag gebeuren veelal bij concentraties van stoffen die hoger zijn dan worden gevonden in water. Hoewel oestrogene en metabolomics effecten (vitellogenin (VTG), CYP1A1) relatief veel voorkomen in watermonster, is de aanwezigheid van neurotoxiciteit ook relatief vaak waargenomen.

Light-dark-transition test Test waarbij spontaan gedrag (spontane beweging) of stimulus-geïnduceerde beweging, bijvoorbeeld als gevolg van een overgang van licht naar donker wordt bepaald met apparatuur om het gedrag van de zebrafissen geautomatiseerd te registreren en te analyseren. Op basis van hetzelfde principe kan geluid (trilling) in plaats van licht/donker worden toegepast.

Korte blootstellingen lijken een sterker effect op het transcriptoom te induceren dan lange blootstellingen, wat mogelijk wordt veroorzaakt door verlies van stoffen uit het de waterfase (degradatie, verdamping, sorptie) of biologische adaptatie van de embryo's. Daarnaast is transcriptoomanalyse representatief voor een snelle respons in een organisme die zal na langere tijd zal afnemen. Omdat transcriptoommetingen duurder zijn dan gedragstesten, zijn gedragsexperimenten nog altijd de eerste aanbeveling voor een snelle neurotoxiciteitstest, maar zijn er hogere concentratiefactoren nodig. De transcriptoommetingen toegepast door de VU zijn gericht op specifieke mechanismen waardoor andere neurotoxische werkingsmechanismen over het hoofd gezien zouden kunnen worden. Effecten op gedrag kunnen worden veroorzaakt door veel verschillende processen en is daardoor geschikt om meerdere neurotoxische werkingsmechanismen te detecteren.

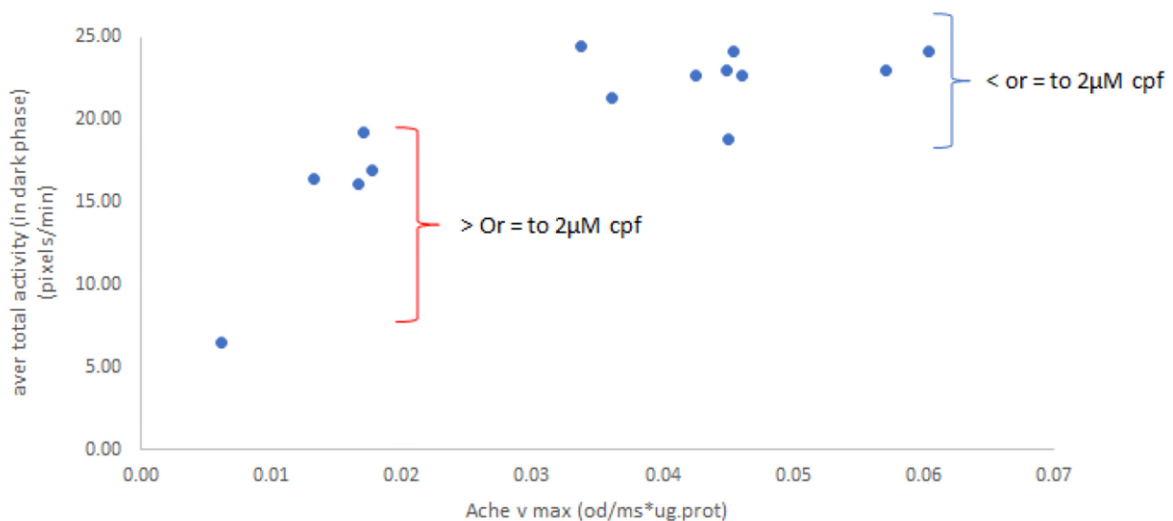
Fase 3: Ringonderzoek

Binnen het ringonderzoek zijn Diazinon, zijn actieve metabool Diazoxon en een waterextract gespiket met Diazinon getest in verschillende laboratoria met hun in-house gedragstestsysteem. De meeste laboratoria gebruikte een Light-dark-transition test waardoor deze resultaten konden worden vergeleken. Voor de individuele stoffen werden vergelijkbare resultaten gevonden. Voor de gespikete extracten liepen de resultaten uiteen. Het is aangenomen dat het toepassen van zeer verschillende blootstellingsprocedures (bv. glas vs. plastic platen, temperatuurverschillen) hebben bijgedragen aan de waargenomen verschillen (niet verder onderzocht). Complexe mengsels zoals watermonsters zouden gevoeliger kunnen zijn voor verschillen in het blootstellingsprotocol. Daarbij liep de geteste concentratie range ook meer uiteen vergeleken met de individuele stoffen. In deze fase is geen korte blootstelling toegepast en zijn geen veranderingen in het transcriptoom gemeten.

De reproduceerbaarheid tussen de laboratoria was goed bevonden voor de individuele stoffen, ondanks dat er verschillende methoden werden gebruikt. Voor het testen van complexe mengsels zoals watermonsters is het voorstel om een gestandaardiseerd testprotocol te ontwikkelen. Het onderzoek van de VU toont ook verschillen tussen bemonsteringsmethoden aan (POCIS, SR sheets, groot-volume extractie samples), wat verder onderzocht zou moeten worden.

Zebravis bioassay analyse

In een ander project is de dosis-response relatie tussen veranderingen in de acetylcholineesterase (AChE) activiteit van de zebravis embryo's en hun gedrag gemonitord. Er kon een drempelwaarde worden geïdentificeerd waar de enzymactiviteit zo sterk geremd was dat gedragsveranderingen werden getriggerd (Figuur 5). Veranderingen onder die drempelwaarde leidden niet tot veranderingen in gedrag. Dit toont de hogere gevoeligheid van biomoleculaire metingen vergeleken met de gedragsmetingen aan. Deze bioassay is aanzienlijk kostenefficiënter dan een transcriptomics onderzoek.



Figuur 5. Correlatie tussen gedragsparameters (gemiddelde van totale activiteit gedurende donkere fasen) en AChE enzymactiviteit (Vmax) voor 5-dagen oude zebravislarven blootgesteld aan toenemende concentraties chlorpyrifos (cpf). Onder de 2 μ M verandert de AChE activiteit, maar niet het gedrag, boven de 2 μ M correleert de AChE activiteit met een afname in activiteit.

Deze voorbeeldstudies van de VU tonen aan dat gedragstesten en bioassay metingen met zebravisembryo's toegepast kunnen worden voor het bepalen van de aanwezigheid van neuroactieve stoffen in waterextracten.

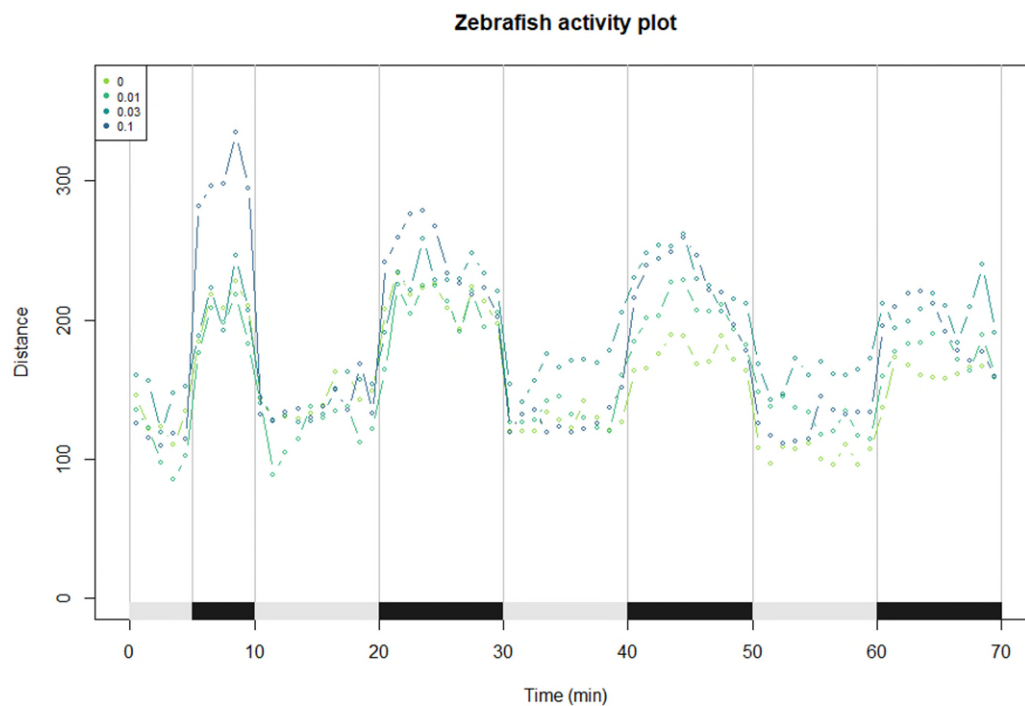
3.4.2 Voorbeeldstudie 2 (RIVM)

Zebravissen bij het RIVM

Het RIVM (www.rivm.nl/rivm/organisatie/centrum-gezondheidsbescherming) werkt met zebravissen voor (neuro)toxiciteitstesten. De zebravis wordt hier gebruikt als model om werkingsmechanismen van chemische stoffen te ontrafelen en de effecten van individuele stoffen en mengsels op onder andere algemene embryonale ontwikkeling, skeletontwikkeling, bloedvatontwikkeling, reproductie en (ontwikkeling van) het zenuwstelsel te onderzoeken.

Deze experimenten in zebravissen worden uitgevoerd in het water waarin de vis leeft, wat inhoudt dat in principe alle stoffen getest kunnen worden zolang ze oplosbaar zijn in water, al dan niet gefaciliteerd door een lage concentratie oplosmiddel zoals dimethylsulfoxide (DMSO) of ethanol. Dit maakt de zebravis een geschikt model om (mengsels van) stoffen die voorkomen in bijvoorbeeld drinkwater of oppervlaktewater te testen.

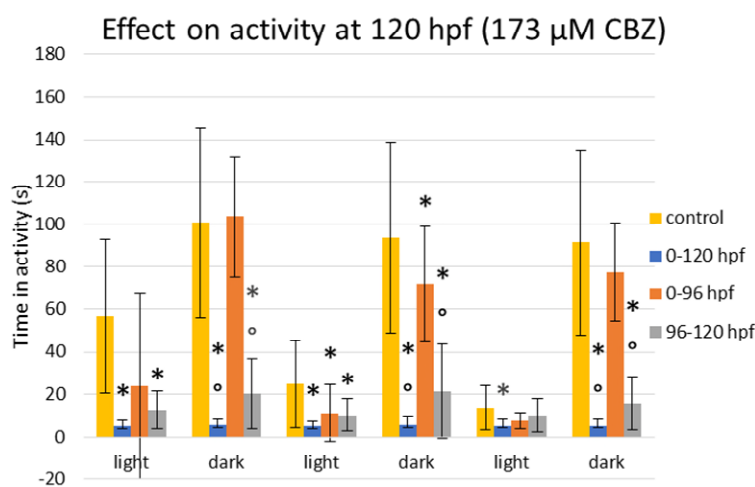
Het RIVM beschikt over de apparatuur om het gedrag van de zebravissen geautomatiseerd te registreren en te analyseren. Een voorbeeld van een experiment waarin gebruik is gemaakt van de Light-dark transition test is in de 'zebrafish activity plot' weergegeven (Figuur 6). Met behulp van dit type experimenten kunnen verschillende typen effecten op het zenuwstelsel gedetecteerd worden zoals hyper- en hypoactiviteit, maar ook stereotiep gedrag, bewegingsstoornissen en effecten die lijken op epilepsie.



Figuur 6. Gemiddelde activiteit van zebravissen die zijn blootgesteld aan verschillende concentraties (μM) van een neuroactief bestrijdingsmiddel. Er wordt een hogere activiteit geregistreerd in de donkere perioden (zwarte blokken) dan in de lichte perioden (witte blokken).

In dit experiment zijn de embryo's blootgesteld aan een neuroactief bestrijdingsmiddel in verschillende concentraties (in μM). Figuur 6 laat de gemiddelde activiteit per minuut zien op een leeftijd van 120 uur, weergegeven als totale afstand afgelegd in millimeter in het licht (lichtgrijze balk X-as) en in het donker (zwarte balk). Het is uit de grafiek duidelijk op te maken dat de vissen actiever zijn in het donker dan in het licht. Uit de verschillend gekleurde lijnen valt daarbij op te maken dat blootstelling van de vissen al bij concentraties in de nanomolair range een toename in activiteit laat zien tijdens zowel de lichte als donkere periode. Hierbij valt op dat de afname in respons op de licht-donker overgang die te zien is in de controle groep (lichtgroene lijn) bij de blootgestelde vissen in mindere mate lijkt plaats te vinden; ze blijven actiever dan de niet blootgestelde vissen. De hier gepresenteerde data is onderdeel van een recent gestart onderzoek naar de ontwikkelingstoxiciteit van mengsels van pesticiden.

Vergelijkbare experimenten zijn uitgevoerd met geneesmiddelen (onder andere psychofarmaca en anti-epileptica) waarvan bekend is dat ze in het milieu voorkomen. In dit project is gebruik gemaakt van verschillende blootstellersperioden (0-120 uur, 0-96 uur en 96-120 uur) om te onderzoeken of er de vissen in bepaalde ontwikkelingsstadia gevoeliger zijn voor blootstelling aan dit type stoffen. Dit soort gegevens zijn van belang bij het interpreteren van data en het opzetten van experimenten waarbij ontwikkelingsneurotoxiciteit onderzocht wordt. Figuur 7 toont een voorbeeld uit deze dataset. Dit staafdiagram geeft eenzelfde soort data weer als de eerdere grafiek: van links naar rechts zijn het gemiddelde activiteitsniveau weergegeven in een opeenvolgende serie licht en donker wisselingen van vier groepen vissen. De grafiek geeft de gemiddelde activiteit weer van vissen op een leeftijd van 120 uur. De 4 verschillende groepen zijn controle vissen (niet blootgesteld, gele balk) of vissen die zijn blootgesteld aan carbamazepine van 0-120 uur (blauwe balk), van 0-96 uur (oranje balk) en blootgesteld van 96-120 uur (grijze balk). De leeftijd nul uur is in dit geval het stadium van bevruchte eicel.

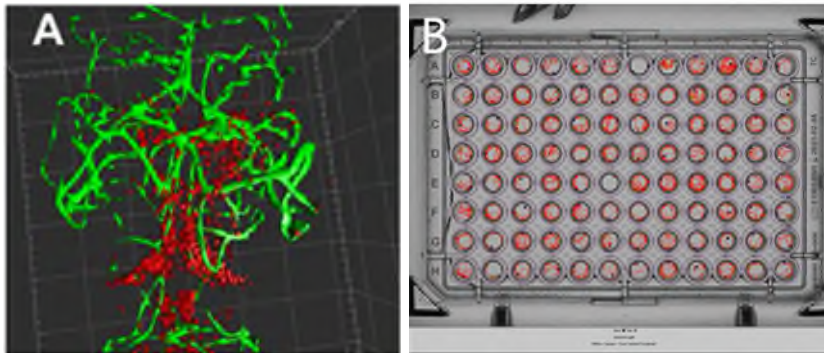


Figuur 7. Licht-donker reactie van vissen blootgesteld aan carbamazepine.

Uit deze data blijkt dat blootstelling aan carbamazepine van 0-120 uur (blauwe balken) alle activiteit van de vis minimaliseert in licht en donker. De oranje balk laat zien dat dit effect niet optreedt als de vis wordt blootgesteld van 0-96 uur aangezien de activiteit vergelijkbaar is met de niet-blootgestelde vissen (gele balk). Deze data laat zien dat de gevoelige periode voor deze stof tussen de 96 en 120 uur ligt. Dit wordt bevestigd door de experimenten waarbij de vissen zijn blootgesteld van 96 tot 120 uur (publicatie in voorbereiding).

Beeldvormende technieken

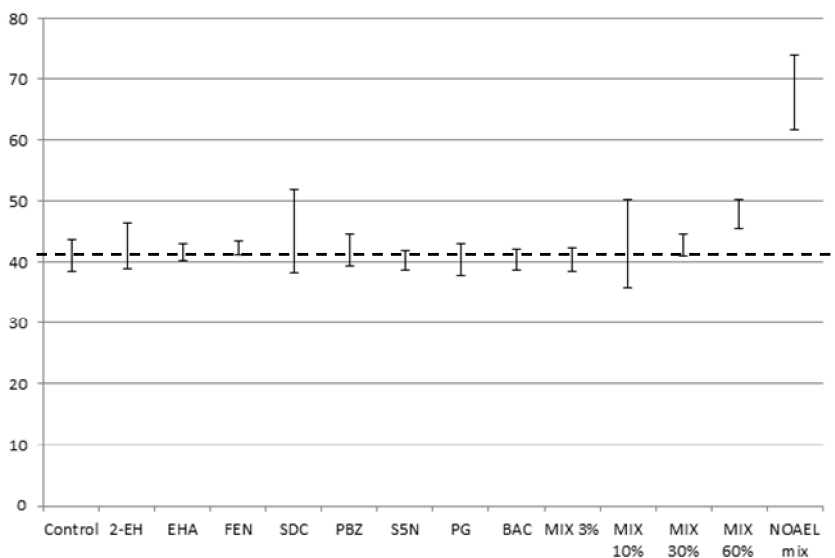
De transparantie van de zebravis maakt het mogelijk om de ontwikkeling van bijvoorbeeld het skelet, maar ook de ontwikkeling van het zenuwstelsel, te bestuderen of zelfs te volgen over de tijd. Hierbij kan gebruik gemaakt worden van genetische gemodificeerde vissen waarvan bepaalde cellen of organen fluorescent gelabeld zijn waardoor de ontwikkeling in de levende vis gevolgd kan worden. Bij het RIVM zijn alle technieken in huis om dit soort kleuringen uit te voeren (Figuur 8).



Figuur 8. A. Voorbeeld van beweegpatroon analyse voor het meten van gedragsveranderingen in zebrafish embryo's. Zichtbaar is de multi-well plaat en het visueel geregistreerde beweegpatroon van het embryo in de well. B. Voorbeeld van de toepassing van een fluorescente kleuring van bloedvaten (groen) en specifieke (GABAerge) neuronen (rood) in het ontwikkelende brein [publicaties in voorbereiding].

Mengseltoxiciteit

In een onderzoek naar de mogelijkheden om (ontwikkelings)toxiciteit van mengsels te kunnen testen (EuroMix; EU-gefinancierd) heeft het RIVM de zebrafish ingezet als onderzoeksmodel. De uitleesparameter was in deze experimenten verstoring van de normale skeletontwikkeling welke leidt tot misvormingen van het kopskelet. In deze experimenten is gebruik gemaakt van een serie stoffen waarvan bekend is dat ze de ontwikkeling van het skelet verstoren. In een serie experimenten, waarbij gebruik is gemaakt van een mengsel van lage concentraties van stoffen waarvan de individuele stoffen geen effect laten zien (Figuur 9), heeft het RIVM aangetoond dat ook de toxiciteit van (complexere) mengsels (acht stoffen) goed gedetecteerd kan worden in de zebrafish.



Figuur 9. Score voor skelet afwijkingen van zebrafish embryo's die blootgesteld zijn aan verschillende chemische stoffen. De waarde aangegeven voor controle (Control) is de score waarbij de vissen niet blootgesteld zijn. In deze grafiek is van alle stoffen de spreidingsmaat rond het gemiddelde aangegeven. Een mengsel van deze acht stoffen, die individueel geen effect laten zien (gelijk aan de controle score), veroorzaakt een sterk effect (NOAEL mix). Verlaging van de individuele stof concentraties tot 60% van de individuele no-effect concentraties induceert nog steeds een toename in skelet afwijkingen.

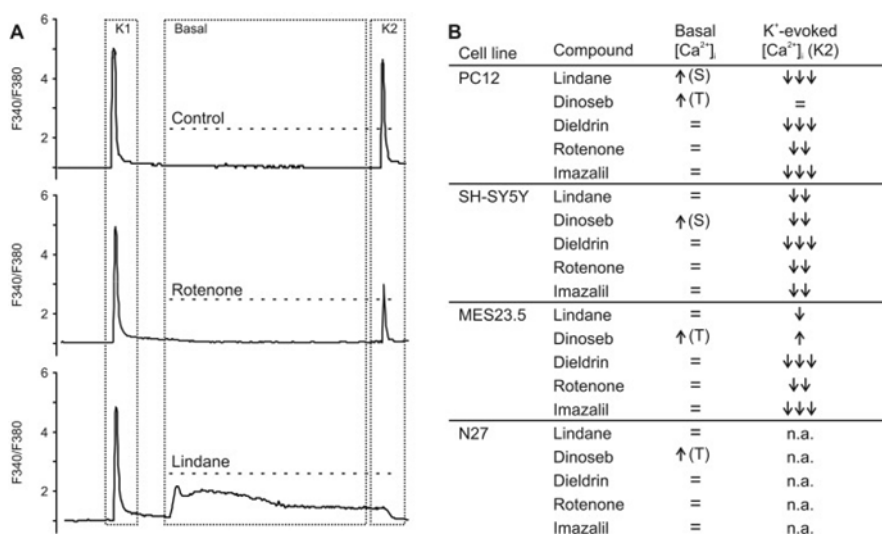
3.4.3 Voorbeeldstudie 3 (Neurotoxicology Research Group, Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS))

In EU onderzoeksprojecten DEMAU (www.demau-fp7.eu) en SOLUTIONS (solutions-project.eu) werd onderkend dat voor sommige (gezondheids)effecten nog onvoldoende relevante testen zijn opgenomen in voorgestelde bioassays voor waterkwaliteit (Escher et al. 2014; Schriks et al. 2015; reviewed in Dingemans et al. 2018). In het lopend CEC-partnership project EMERCHE (www.cec-partnership.nl) zijn door onderzoekers van het IRAS *in vitro* modellen voor neurotoxiciteit geprioriteerd als kandidaat bioassays. Om relevante eindpunten (effecten) te identificeren die nog niet worden toegepast voor waterkwaliteitsmetingen is een overzicht van bioassays, gerangschikt naar type biologische effecten en daaraan gerelateerde mogelijke gezondheidseffecten, vergeleken met de bekende biologische effecten en daaraan gerelateerde mogelijke gezondheidseffecten van waterrelevante stoffen. Hieruit bleek dat met namen specifieke effecten op het zenuwstelsel slechts zeer beperkt worden meegenomen in waterkwaliteitsbeoordeling (Gkika et al. 2019).

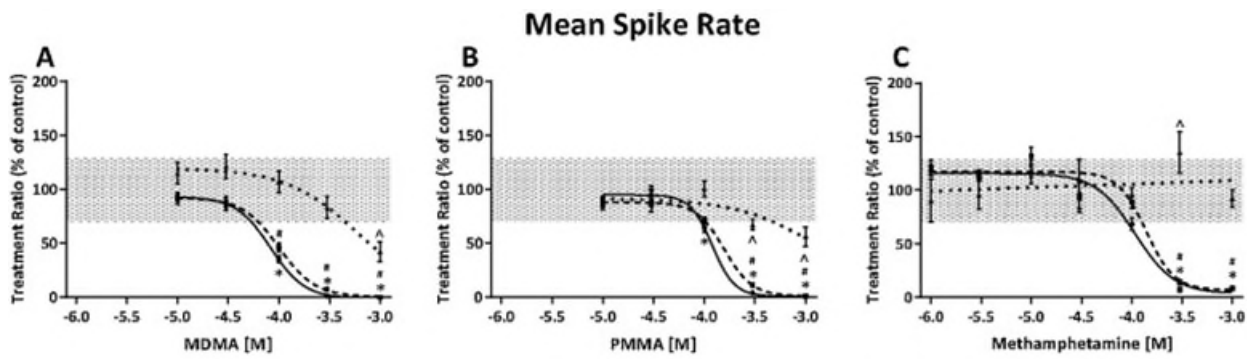
Er bestaan veel verschillende *in vitro* celmodellen voor het onderzoeken van sleutelprocessen in het zenuwstelsel. Bij de onderzoeksgroep Neurotoxicologie (www.neurotoxicology.nl) wordt al vele jaren onderzoek gedaan naar de ontwikkeling en toepassing van *in vitro* en alternatieve celmodellen voor neurotoxiciteitsstudies, risicobeoordeling en toelatingsprocessen van nieuwe chemicaliën en geneesmiddelen.

Er kan onderscheid worden gemaakt tussen specifieke celprocessen (cel dood, apoptose, oxidatieve stress), specifieke neurotoxiciteitsprocessen (calciumsignalen, neurotransmitterafgifte, opname van neurotransmitters, neurotransmitterreceptor-functie), en geïntegreerde processen (netwerkactiviteit). Deze verschillende processen worden met verschillende technieken (biochemie, fluorescentiemicroscopie, elektrofysiologie) in verschillende celmodellen onderzocht (meer informatie: ntx.iras.uu.nl/techniques). Hetzelfde proces kan in sommige gevallen in meerdere verschillende celmodellen worden onderzocht, bijvoorbeeld stamcellen, primaire celkweken en cellijnen. De individuele eigenschappen van de verschillende celmodellen, bijvoorbeeld de af- of aanwezigheid van een specifieke neurotransmitterreceptor, kunnen ze meer of minder geschikt maken voor een bepaalde neurotoxiciteitstest (meer informatie: ntx.iras.uu.nl/in_vitro_systems).

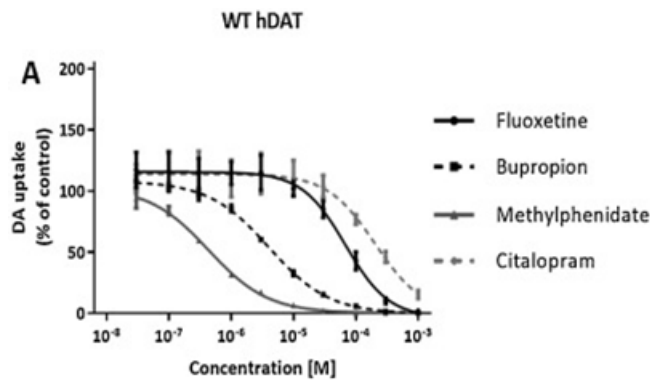
In deze *in vitro* modellen zijn door de onderzoeksgroep effecten van allerlei groepen en typen stoffen en geneesmiddelen ontdekt op cellulaire en moleculaire processen in de ontwikkeling en functie van het zenuwstelsel. Onderstaande figuren laten voorbeelden zien van de effecten van op basis van hun toepassing voor waterkwaliteit mogelijk relevant geachte stoffen (genoemd in de onderschriften) op verschillende neurofysiologische processen (Figuren 10 t/m 15). In sommige gevallen werd het effect bij gezamenlijke blootstelling versterkt, ook al ging het om verschillende soorten stoffen, bijvoorbeeld insecticiden uit verschillende structurele groepen (Meijer et al. 2014).



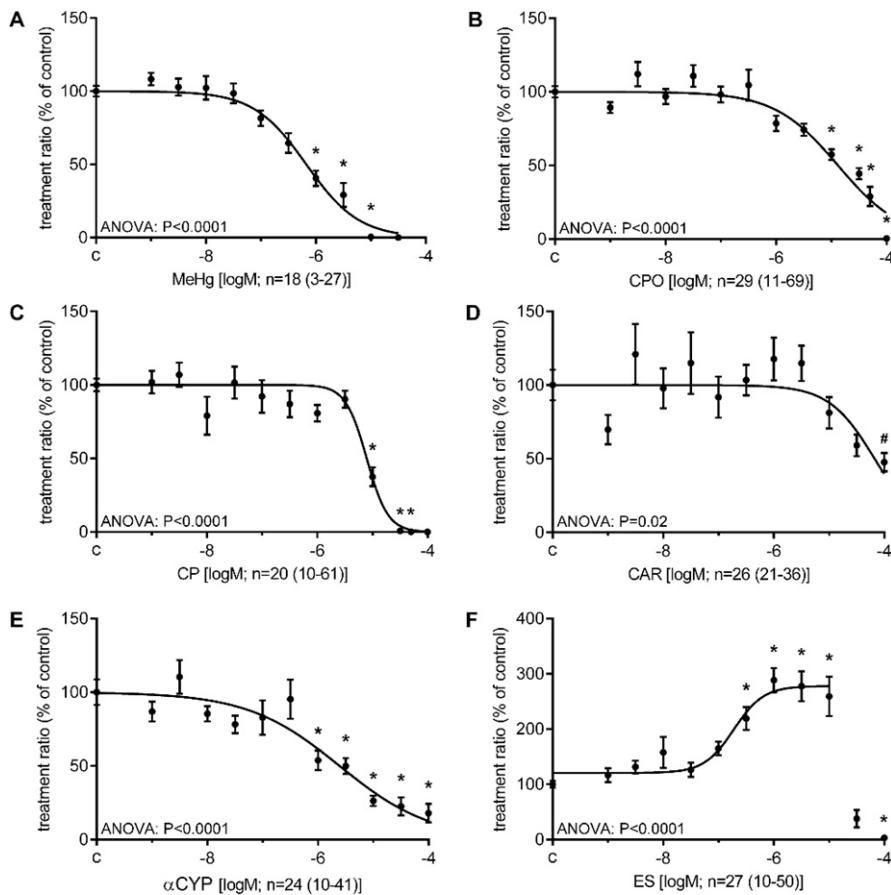
Figuur 10. Effecten van gewasbeschermingsmiddelen (lindane, dinoseb, dieldrin, rotenone, imazalil) op calcium signalen in verschillende cellijnen. A. Voorbeeldmetingen in individuele PC12 cellen met respectievelijk stimulerende en remmende effecten van gewasbeschermingsmiddelen op achtergrond calciumconcentraties en calcium signalen bij depolarizatie. B. Samenvatting van effecten van de verschillende gewasbeschermingsmiddelen in de verschillende celmodellen. Meer informatie: Heusinkveld en Westerink 2017.



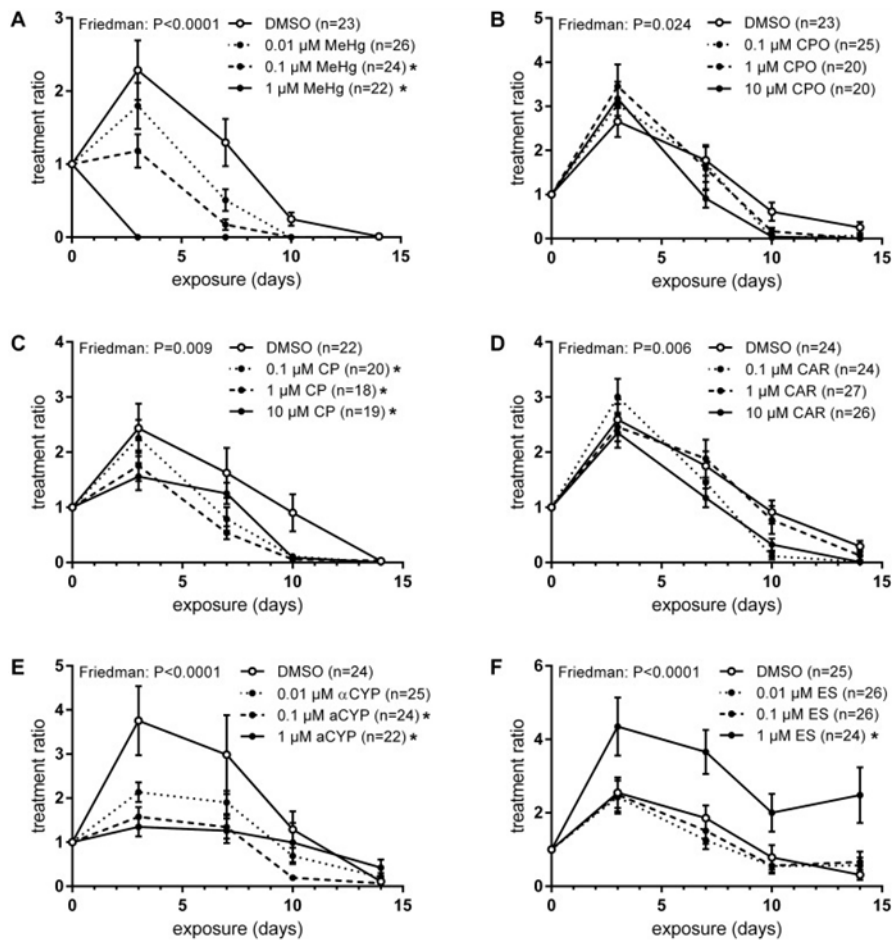
Figuur 11. Effecten van illegale drugs (MDMA, PMMA, metamfetamine) op de elektrische activiteit van primaire cortexkweken op micro-electrode arrays bij kortdurende blootstelling. Meer informatie: Zwartsen et al. 2019a.



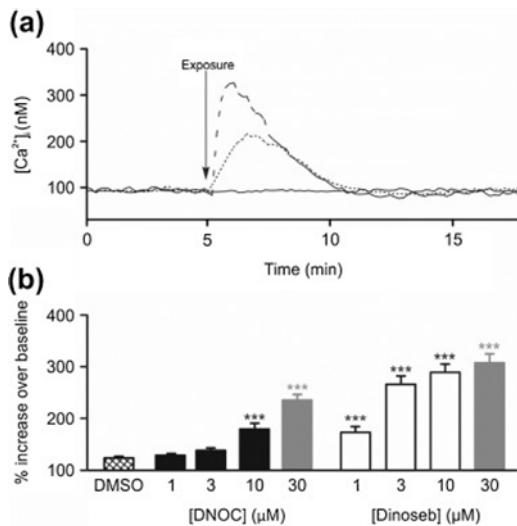
Figuur 12. Concentration-effect curves van de inhibitie van dopamine-opname in neuronen via de dopamine-receptor door medicijnen (fluoxetine, bupropion, methylphenidate, citalopram). Meer informatie: Zwartsen et al. 2019b.



Figuur 13. Effecten van methylkwik en verschillende insecticiden (chlorpyrifos-oxon; chlorpyrifos; α -cypermethrin en endosulfan) op de elektrische activiteit van primaire cortexkweken op micro-electrode arrays bij kortdurende blootstelling. Meer informatie: Dingemans et al. 2016.



Figuur 14. Effecten van methylkwik en verschillende insecticiden (chlorpyrifos-oxon; chlorpyrifos; carbaryl; α -cypermethrin en endosulfan) op de elektrische activiteit van primaire cortexkweken op micro-electrode arrays bij langdurige blootstelling. Meer informatie: Dingemans et al. 2016.



Figuur 15. Effecten van dinitrofenol herbiciden (DNOC en dinoseb) op de achtergrond calcium concentratie in individuele PC12 cellen. A. Voorbeeld metingen. B. Concentratie-responsie. Meer informatie: Heusinkveld et al. 2016.

Welke van deze methoden gebruikt kunnen worden voor waterkwaliteitsmetingen hangt mede af van de complexiteit van het model (celtype), de complexiteit van de gebruikte meetmethode, en de gevoeligheid van de bemeten processen voor in het water aanwezige verontreinigingen (bij relevante concentraties). De toepasbaarheid kan worden vastgesteld in nader onderzoek waarin waterextracten, met geschikte monstervoorbewerking, worden bemeten. Voor waterkwaliteitsmetingen met bioassays voor neurotoxische effecten is voorzien dat ook een getrapte aanpak kan worden ontwikkeld.

3.5 Onderzoek internationaal

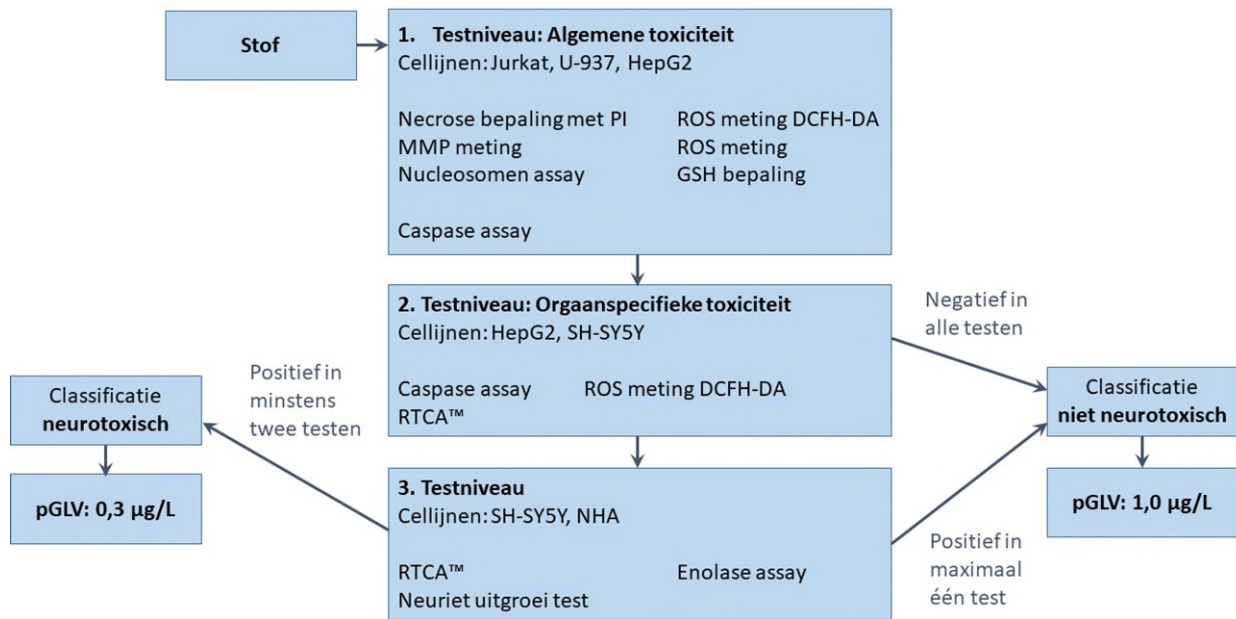
Op internationaal niveau zijn er verschillende initiatieven die zich richten op (ontwikkelings)neurotoxiciteitstesten en het opzetten van een teststrategie. Een voorbeelden worden hieronder beschreven.

Het Duitse project NeuroBox is een vervolg op het ToxBox project en heeft als doel om een batterij bioassay testen te ontwikkelen, specifiek voor neurotoxische effecten van antropogene stoffen in de waterketen. Dit project omvat zes deelprojecten, die door de Umweltbundesamt (UBA) in Bad Elster worden gecoördineerd.

Er wordt gewerkt aan de kweek en netwerkvorming van humane cellijnen en een model voor de bloed-hersenbarrière (Umweltbundesamt Bad Elster), betekenis van neurotoxische effecten in visembryo's voor zoogdieren (Universiteit Heidelberg), neurotoxische werkingsmechanismen en biomarkers in visembryo's en muizen (Rheinisch-Westfälische Technische Hogeschool (RWTH) Aachen), relatie tussen hormonale en neurotoxische embryonale effecten (Hogeschool Darmstadt), identificatie van neuroactieve stoffen door middel van effect-directed analyse (Betriebs- und Forschungslabor des Zweckverbands Landeswasserversorgung in Langenau) en identificeren en toxicologisch karakteriseren van neurotoxische stoffen in watermonsters door middel van zebrais testen en effect-directed analyse (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig). Hieruit zijn o.a. een publicatie over (neuro)toxiciteit profiling van vervuild sediment met zebraisembryo's (Massei et al., 2019), een review over 25 stoffen die de werking van het schildklierhormoon van zebraisembryo's verstoren (Spaan et al., 2019) en een review dat een overzicht geeft van de huidige status van hazard karakterisering, effecten bioassays en chemische benaderingen ten aanzien van neurotoxiciteit in organismen en ecosystemen (Legradi et al. 2018) voortgekomen. Aangezien het NeuroBox project nog niet is afgerond, worden er meer publicaties op dit gebied verwacht.

Ook in het eerdere ToxBox project is een mogelijk teststrategie voor neurotoxiciteit in watermonsters bedacht, zoals beschreven in de "Leitfaden". De schematische weergave van deze teststrategie is weergegeven in Figuur 16. Tevens wordt in dit document het gebruik van zebraisembryo's beschreven.

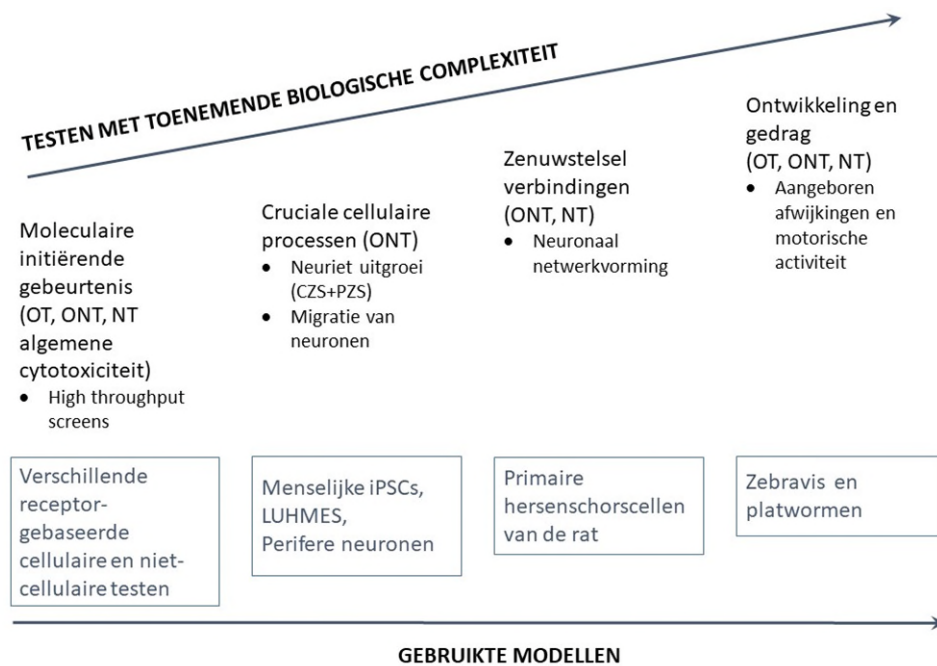
Binnen de NORMAN Working Group 'Bioassays and biomarkers in water quality monitoring' is een Joint Programme of Activities (JPA) 2018/2019 onderzoek uitgevoerd waarin gekeken is naar bioassays voor de evaluatie van neuroactieve en neurotoxische opkomende verontreinigingen met als doelen 1) gezamenlijk een manuscript te schrijven over neurotoxiciteit als een opkomend mechanisme voor waterkwaliteitsmonitoring (Legradi et al. 2018), 2) het organiseren van een vervolgworkshop over aquatische neurotoxiciteit, bewustwording te creëren en samenwerking tussen geïnteresseerde stakeholders te bewerkstelligen en 3) een interlaboratorium activiteit organiseren om de toepassing en bruikbaarheid van bioassays voor neurotoxiciteit te laten zien (NORMAN, 2019). Uit de uitvraag voor deelname aan het ringonderzoek bleek dat er een groot aantal veelbelovende bioassays voor neurotoxiciteit beschikbaar zijn, maar dat de meeste (bv. neuronen, stamcellen) erg duur zijn en niet uitgevoerd konden worden met de beschikbare financiering. Hoewel de interesse hoog was, namen er aan het ringonderzoek slechts een paar laboratoria deel. Dit onderzoek is reeds beschreven door Dr. J. Legradi in hoofdstuk 2.4.1 van dit rapport. De publicatie hiervan volgt.



Figuur 16. Schematische weergave voor *in vitro* testen van mogelijke neurotoxiciteit (overgenomen uit Grummt et al. 2018). PI: propidium jodide, MMP: matrix metalloproteinase, ROS: reactieve zuurstofdeeltjes, DCFH-DA: Dichloro-dihydro-fluoresceïn diacetate assay, GSH: glutathion, RTCA™: real-time cell analysis, pGLV: voorlopige richtlijnwaarde.

De EFSA (2018) heeft een uitgebreid literatuuronderzoek gepubliceerd, waarin geconcludeerd wordt dat primaire knaagdiercellen of –weefsels naast *C. elegans* het meest voorspellend zijn en een grote verscheidenheid aan eindpunten kunnen omvatten. Hoewel dit onderzoek niet specifiek gericht is op het testen van waterkwaliteit, geeft dit een heel mooi overzicht van hoe er vanuit wet- en regelgeving naar alternatieve methoden voor neurotoxiciteit wordt gekeken. Tegenwoordig wordt er in plaats van weefsel ook veel gewerkt met stamcellen. Voor soortspecifieke effecten is het aanbevolen om humane modellen te gebruiken. Daarom zijn er recent veel methoden met humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSC) ontwikkeld. Op dit moment zijn er nog te weinig gegevens om te concluderen dat hiPSC primaire knaagdiercellen kunnen vervangen. Wat betreft alternatieve organismen is de meeste data beschikbaar voor *C. elegans*. De zebravis is volgens de EFSA ook een veelbelovend alternatief organisme voor neurotoxiciteitstesten. Idealiter omvat een testbatterij voor neurotoxiciteit aangetoonde en relevante werkingsmechanismen voor neurotoxiciteit.

Het National Toxicology Program (NTP) heeft een samenwerkingproject met ongeveer veertig deelnemers uit verschillende domeinen van academie, industrie, overheid en autoriteiten gecoördineerd waarin meetgegevens van *in vitro* testen en alternatieve modelorganismen zijn geanalyseerd met behulp van benchmark concentratie modelleren (BMC). Hierdoor konden de resultaten van de verschillende testen onderling worden vergeleken. De resultaten van dit onderzoek zijn openbaar (Behl et al. 2019). Figuur 17 geeft een overzicht van de gebruikte testbatterij voor ontwikkelingsneurotoxiciteit met toenemende biologische complexiteit. In de gebruikte modellen (geïnduceerde meervoudig potente menselijk stamcellen, geïmmortaliseerde cellijnen en primaire cellen van ratten) kunnen steeds meer belangrijke cellulaire processen, zoals differentiatie en uitgroei van neuronen en neuronaal netwerkvorming worden onderzocht. Aan het einde van de testbatterij staan organismen zoals de zebravis en platwormen voor het bestuderen van complex gedrag (voortbewegingsactiviteit) en aangeboren afwijkingen in zebravis en platwormen.



Figuur 17. Schematische overzicht van de NTP testbatterij voor ontwikkelingsneurotoxicologie (overgenomen uit Behl et al. 2019 en aangepast). OT: ontwikkelingstoxicologie, ONT: ontwikkelingsneurotoxicologie, NT: neurotoxicologie, CZS: centraal zenuwstelsel, PZS: perifeer zenuwstelsel, iPSCs: geïnduceerde meervoudig potente stamcellen, LUHMES: geïmmortaliseerde cellijn van menselijke middenhersenen.

Kennisleemten die in uit dit onderzoek naar voren kwamen zijn de beperkte mogelijkheden voor het vergelijken van een grote diversiteit aan chemische en biologische meetgegevens binnen een systematisch kader, het ontbreken van een consensus over de beste analyse en interpretatie van meetgegevens van *in vitro* testen en testen in alternatieve organismen, de behoefte om de dataset uit te breiden door aanvullende stoffen te testen en de uitdaging om onderscheid te kunnen maken tussen ontwikkelingstoxiciteit, ontwikkelingsneurotoxiciteit en neurotoxiciteit. Dat laatste is echter minder relevant als het hoofddoel is om stoffen te prioriteren voor vervolgonderzoek (Behl et al. 2019).

De internationale initiatieven op het gebied testen en teststrategieën voor (ontwikkelings)neurotoxiciteit zijn niet beperkt tot bovenstaande voorbeelden. Veel onderzoeksgroepen wereldwijd werken in dit onderzoeksveld en hebben in het afgelopen decennium bijgedragen aan belangrijke ontwikkelingen op dit gebied (Aschner et al., 2017; Bal-Price et al., 2012, 2015; 2018; Coecke et al., 2007; Crofton et al., 2011, 2012; Fritsche et al., 2018; Kadereit et al. 2012; Lein et al., 2007; Smirnova et al., 2014).

4 Conclusie en aanbevelingen

Neurotoxiciteit is een complex toxicologisch eindpunt en moeilijk in te schatten met één simpele bioassay. Een getrapte teststrategie waarin verschillende bioassays gecombineerd worden is daarom noodzakelijk om mogelijk nadelige gezondheidseffecten te kunnen duiden. Voor het bepalen van de chemische waterkwaliteit is het essentieel dat een methode snel en kostenefficiënt is, geschikt is voor high-throughput en betrouwbare resultaten oplevert.

Kandidaat bioanalytische tools die relatief simpel zijn, kosteneffectief en snel uitgevoerd kunnen worden (screening) zijn bijvoorbeeld bioassays met neuronale knaagdiercellen, geïmmortaliseerde humane stamcellijnen, cellijnen geïsoleerd uit neoplasmen en primaire humane astrocyten. Belangrijk hierbij is dat de uitleesparameter ook kosteneffectief en snel is, bijvoorbeeld gebaseerd op weerstandsmetingen, fluorescentiespectroscopie en multichannel parallel microscopie cytometrie.

Kandidaat bioassays voor integrale risicobeoordeling zijn meer geavanceerde modellen die ingezet kunnen worden voor verder onderzoek na prioritering op basis van de resultaten van een screening met de bioanalytische tools, zoals muis embryonale stamcellen en zebrafissen. Als uitleesparameter kunnen meer complexe en kostbare technieken worden gebruikt, zoals FACS, immunocytochemie, high-content imaging en functional –omics, hoewel eenvoudige technieken en kostenefficiënte technieken op een geavanceerd model ook kunnen volstaan. Het is te verwachten dat er in de toekomst ontwikkelingen zijn waardoor geavanceerde modellen een hogere throughput kunnen krijgen en bereikbaarder worden voor waterkwaliteitsmonitoring.

Naast het onderscheid tussen bioanalytische tools en bioassays voor integrale risicobeoordeling kan er ook onderscheid gemaakt worden tussen bekende en onbekende (groepen van) stoffen. Stofgroepen waarvan bekend is dat ze neurotoxiciteit in de mens veroorzaken, zoals organofosfaten, antidepressiva, oestrogenen en illegale genotsmiddelen, kunnen bij uitstek gemeten worden met testen die gevoelige aangrijpingspunten hebben. Mogelijke humane neurotoxiciteit van dergelijke stoffen kan worden onderzocht met behulp van standaard specifieke assays in menselijke cellijnen en/of enzymen, zoals de AChE inhibitie assay, maar daarnaast ook de dopamine (DAT), norepinephrine, (NET) en serotonine (SERT) inhibitie assays. Deze bioassays zijn allemaal behoorlijk gevoelig en hebben een relatief hoge throughput, maar ze omvatten steeds één aangrijpingspunt. Wanneer het om bekende individuele stoffen gaat, bieden chemische analyse en risicobeoordeling op basis van beschikbare gegevens of vergelijken met soortgelijke stoffen (QSAR, read across) ook uitkomst.

Wanneer het onbekend is welke stoffen een watermonster bevat of het niet bekend is of de (groepen van) stoffen neurotoxiciteit veroorzaken, kunnen meer geavanceerde modellen ingezet worden zoals de zebrafis of MEA. De zebrafis heeft een dubbele waarde vanwege het belang voor ecotoxiciteit en humane toxiciteit. De zebrafis is geschikt voor teratologie (bestuderen van aangeboren afwijkingen) en gedragsstudies, is redelijk kosteneffectief en heeft een redelijke throughput. Een nadeel van het gebruik van zowel modelorganismen als dierlijke cellijnen is dat er geen menselijke cellen of weefsels worden gebruikt, wat de vertaling van de resultaten naar mogelijke nadelige gezondheidseffecten voor de mens bemoeilijkt.

Als brug tussen de vis en de specifieke assays kan een geïntegreerde bioassay zoals de MEA worden toegepast. MEA hebben een redelijke throughput, er zijn meerdere targets aanwezig, effecten kunnen gemakkelijk te interpreteren zijn (bv. beroerte en spiervlamming) en ze zijn ook geschikt voor het bestuderen van ontwikkelingsneurotoxicologie. MEA kunnen bestaan uit humane iPSC's, echter dat is erg kostbaar. Een beperking ten opzichte van de zebrafis is dat ADME (absorptie, distributie, metabolisme en uitscheiding) niet plaatsvinden in MEA en ze kennen ook een brede range van minder gemakkelijk te interpreteren effecten.

Het testen van complexe mengsels waarbij verontreinigingen in lage concentraties aanwezig zijn, zoals bij watermonsters, vraagt om een hele andere aanpak dan individuele stoffen. Praktisch gezien is het mogelijk om watermonsters in bovengenoemde neurotoxiciteitstesten te bestuderen, maar de interpretatie van resultaten, bijvoorbeeld met een effect-signaalwaarde, kan lastig zijn, zeker als het gaat om uitspraken over mogelijk nadelige effecten voor de gezondheid. Net als bij andere bioassays moet er ook voor neurotoxiciteit een goede manier van bemonsteren worden gekozen. Doordat verontreinigingen in water doorgaans in lage concentraties aanwezig zijn, worden watermonsters vaak geconcentreerd. Bemonsteringstechnieken zijn selectief en hebben haken en ogen die gedeeltelijk te ondervangen zijn. Het blijft echter lastig omdat bij het extraheren van complexe watermengsels de partitie/adsorptie kinetiek nooit helemaal onder controle is. De compositie van het waterextract kan als gevolg hiervan anders zijn dan het ongeconcentreerde monsters. Ook de bemonsteringsduur kan van invloed zijn op de compositie, mede afhankelijk van grote fluctuaties op de locatie door bv. chemische lozingen. Het is aanbevolen om voorafgaand aan de uitvoering van neurotoxiciteitstesten hier goed over na te denken.

Deze literatuurstudie omvat een aantal voorbeelden dat neurotoxiciteitstesten *in vitro* of in alternatieve organismen toepasbaar zijn in de watersector. **Welke modellen en welke technieken nu en in de toekomst het meest geschikt en kosteneffectief zijn, moet op basis van aanknopingspunten uit dit verkennend onderzoek nog verder worden onderzocht.** In het kader van wet- en regelgeving voor de chemische, farmaceutische en voedingsindustrie zijn veel ontwikkelingen, maar ook specifiek op het gebied van waterkwaliteit. Het wordt aanbevolen om deze ontwikkelingen te volgen. In een vervolg op het literatuuronderzoek beschreven in dit rapport, kan er verder worden ingezoomd op verschillende modellen en technieken, bijvoorbeeld door beoogd eindpunt/werkingsmechanisme, noodzaak voor specifieke expertise of apparatuur, mogelijkheid voor high-throughput, kosten en doorlooptijd te bepalen. Kennis over deze eigenschappen draagt bij aan het ontwikkelen van een strategie en het implementeren van neurotoxiciteitstesten voor watermonsters.

5 Referenties

Altenburger R, Scholz S, Schmitt-Jansen M, Busch W, Escher BI. Mixture Toxicity Revisited from a Toxicogenomic Perspective. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46(5): 2508–2522.

Aschner M, Ceccatelli S, Daneshian M, Fritsche E, Hasiwa N, Hartung T, Hogberg HT, Leist M, Li A, Mundi WR, Padilla S, Piersma AH, Bal-Price A, Seiler A, Westerink RH, Zimmer B, Lein PJ. Reference compounds for alternative test methods to indicate developmental neurotoxicity (DNT) potential of chemicals: example lists and criteria for their selection and use. *ALTEX.* 2017;34(1):49-74.

Bal-Price AK, Coecke S, Costa L, Crofton KM, Fritsche E, Goldberg A, Grandjean P, Lein PJ, Li A, Lucchini R, Mundy WR, Padilla S, Persico AM, Seiler AE, Kreysa J. Advancing the science of developmental neurotoxicity (DNT): testing for better safety evaluation. *ALTEX.* 2012;29(2):202-15.

Bal-Price A, Crofton KM, Leist M, Allen S, Arand M, Buetler T, Delrue N, FitzGerald RE, Hartung T, Heinonen T, Hogberg H, Bennekou SH, Lichtensteiger W, Oggier D, Paparella M, Axelstad M, Piersma A, Rached E, Schilter B, Schmuck G, Stoppini L, Tongiorgi E, Tiramani M, Monnet-Tschudi F, Wilks MF, Ylikomi T, Fritsche E. International STakeholder NETwork (ISTNET): creating a developmental neurotoxicity (DNT) testing road map for regulatory purposes. *Arch Toxicol.* 2015 Feb;89(2):269-87.

Bal-Price A, Hogberg HT, Crofton KM, Daneshian M, FitzGerald RE, Fritsche E, Heinonen T, Hougaard Bennekou S, Klima S, Piersma AH, Sachana M, Shafer TJ, Terron A, Monnet-Tschudi F, Viviani B, Waldmann T, Westerink RHS, Wilks MF, Witters H, Zurich MG, Leist M. Recommendation on test readiness criteria for new approach methods in toxicology: Exemplified for developmental neurotoxicity. *ALTEX.* 2018, 35(3):306-352.

Berninger JP, Martinovic-Weigelt D, Garcia-Reyero N, Escalon L, Perkins EJ, Ankley GT, Villeneuve DL. Using Transcriptomic Tools to Evaluate Biological Effects Across Effluent Gradients at a Diverse Set of Study Sites in Minnesota. *USA Environ. Sci. Technol.* 2014, 48:(4) 2404–2412.

Behl M, Ryan K, Hsieh JH, Parham F, Shapiro AJ, Collins BJ, Sipes NS, Birnbaum LS, Bucher JR, Foster PMD, Walker NJ, Paules RS, Tice RR. Screening for Developmental Neurotoxicity at the National Toxicology Program: The Future Is Here. *Toxicol Sci.* 2019 Jan 1;167(1):6-14

Casarett and Doull 2008. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Seventh Edition (Casarett and Doull Toxicology) 7th Edition.* Chapter 16. Toxic responses of the Nervous System. ISBN 9780071470513.

Cho S, Yoon JY. Organ-on-a-chip for assessing environmental toxicants. *Curr Opin Biotechnol.* 2017, 45:34-42.

CIS (Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive). 2019. Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment in the Water Framework Directive - Report to the CIS WG Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on effect-based methods (EBMs). Mandate 2016-2018 [draft report].

Coecke S, Goldberg AM, Allen S, Buzanska L, Calamandrei G, Crofton K, Hareng L, Hartung T, Knaut H, Honegger P, Jacobs M, Lein P, Li A, Mundy W, Owen D, Schneider S, Silbergeld E, Reum T, Trnovec T, Monnet-Tschudi F, Bal-Price A. Workgroup report: incorporating in vitro alternative methods for developmental neurotoxicity into international hazard and risk assessment strategies. *Environ Health Perspect.* 2007, 115(6), 924–31.

Crofton KM, Mundy WR, Lein PJ, Bal-Price A, Coecke S, Seiler AE, Knaut H, Buzanska L, Goldberg A. Developmental neurotoxicity testing: recommendations for developing alternative methods for the screening and prioritization of chemicals. *ALTEX*. 2011;28(1):9-15.

Crofton KM, Mundy WR, Shafer TJ. Developmental neurotoxicity testing: a path forward. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2012 Sep;52(3):140-6.

Dauth S, Maoz BM, Sheehy SP, Hemphill MA, Murty T, Macedonia MK, Greer AM, Budnik B, Parker KK. Neurons derived from different brain regions are inherently different in vitro: a novel multiregional brain-on-a-chip. *J Neurophysiol*. 2017, 17(3):1320-1341.

De Leeuw VC, Hessel EVS, Pennings JLA, Hodemaekers HM, Wackers PFK, van Oostrom CTM, Piersma AH. Differential effects of fluoxetine and venlafaxine in the neural embryonic stem cell test (ESTn) revealed by a cell lineage map. *Neurotoxicology*. 2019, 76:1-9.

Dingemans MM, Schütte MG, Wiersma DM, de Groot A, van Kleef RG, Wijnolts FM, Westerink RH. Chronic 14-day exposure to insecticides or methylmercury modulates neuronal activity in primary rat cortical cultures. *Neurotoxicology* 2016, 57: 194-202.

Dingemans MM, Baken KA, van der Oost R, Schriks M, van Wezel AP. Risk-based approach in the revised European Union drinking water legislation: Opportunities for bioanalytical tools. *Integr Environ Assess Manag*. 2019, 15(1):126-134.

EFSA. 2018. Literature review and appraisal on alternative neurotoxicity testing methods.

<https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1410>

EG 1907/2006. VERORDENING (EG) Nr. 1907/2006 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 18 december 2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH), tot oprichting van een Europees Agentschap voor chemische stoffen, houdende wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en houdende intrekking van Verordening (EEG) nr. 793/93 van de Raad en Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie alsmede Richtlijn 76/769/EEG van de Raad en de Richtlijnen 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG en 2000/21/EG van de Commissie. 2006R1907 — NL — 10.04.2014 — 018.001. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:02006R1907-20140410&from=EN#tocId2>

Ehrlich DJ, McKenna BK, Evans JG, Belkina AC, Denis GV, Sherr D, Cheung MC. Parallel imaging microfluidic cytometer. *Methods Cell Biol*. 2011;102:49-75.

Escher BI, Allinson M, Altenburger R, Bain PA, Balaguer P, Busch W, Crago J, Denslow ND, Dopp E, Hilscherova K, Humpage AR, Kumar A, Grimaldi M, Jayasinghe BS, Jarosova B, Jia A, Makarov S, Maruya KA, Medvedev A, Mehinto AC, Mendez JE, Poulsen A, Prochazka E, Richard J, Schifferli A, Schlenk D, Scholz S, Shiraishi F, Snyder S, Su G, Tang JY, van der Burg B, van der Linden SC, Werner I, Westerheide SD, Wong CK, Yang M, Yeung BH, Zhang X, Leusch FD. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. *Environ Sci Technol*. 2014, 48(3):1940-1956.

Falugi C, Lammerding-Koppel M, Aluigi MG. Sea urchin development: an alternative model for mechanistic understanding of neurodevelopment and neurotoxicity. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2008 Sep;84(3):188-203.

Fox, SI. Human Physiology, Chapter 7: The Nervous System. McGraw-Hill, 2002. ISBN 9780071120753

Freeborn, TJ. Bioimpedance Analysis Using Fractional-Order Equivalent Electrical Circuits. Fractional Order Systems, Optimization, Control, Circuit Realizations and Applications, Advances in Nonlinear Dynamics and Chaos (ANDC), 2018.

Fritsche E, Grandjean P, Crofton KM, Aschner M, Goldberg A, Heinonen T, Hessel EVS, Hogberg HT, Bennekou SH, Lein PJ, Leist M, Mundy WR, Paparella M, Piersma AH, Sachana M, Schmuck G, Solecki R, Terron A, Monnet-Tschudi F, Wilks MF, Witters H, Zurich MG, Bal-Price A. Consensus statement on the need for innovation, transition and implementation of developmental neurotoxicity (DNT) testing for regulatory purposes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018 Sep 1;354:3-6.

Gezondheidsraad. Risico's van prenatale blootstelling aan stoffen. Den Haag: Gezondheidsraad, 2014; publicatienr. 2014/05.

Gkika IS, Gussem De V, Kramer NI, Jonker MTO, Wezel van A. Complementing effect directed monitoring with in vitro bioassays detecting neurotoxicity-related human adverse outcomes currently not screened in water quality assessment. Jaarvergadering van Nederlandse Vereniging voor Toxicologie, 2019, abstract 15.

Grummt T, Braunbeck T, Hollert H, Kramer M. Tox-Box Leitfaden - Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung (Tox Box), 2018.

http://riskwa.de/Verbundprojekte/TOX_BOX-p-52/_/TOXBOX_Leitfaden%202018.pdf

Heusinkveld HJ, van Vliet AC, Nijssen PC, Westerink RH. In vitro neurotoxic hazard characterisation of dinitrophenolic herbicides. *Toxicol Lett*. 2016, 252:62-69.

Heusinkveld HJ, Westerink RHS. Comparison of different in vitro cell models for the assessment of pesticide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2017, 45(Pt 1):81-88.

Hill KL, Hamers T, Kamstra JH, Willmore WG, Letcher RJ. Optimization of an in vitro assay methodology for competitive binding of thyroidogenic xenobiotics with thyroxine on human transthyretin and albumin. *MethodsX*. 2017, 4:404-412.

Hondebrink L, Zwartsen A, Westerink RHS. Effect fingerprinting of new psychoactive substances (NPS): What can we learn from in vitro data? *Pharmacol Ther*. 2018, 182:193-224.

Horzmann KA, Freeman JL. Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity. *Toxics*. 2016, 4(3): pii: 19.

Hyo Jeong Kim, Preeyaporn Koedrith, Young Rok Seo, Ecotoxicogenomic Approaches for Understanding Molecular Mechanisms of Environmental Chemical Toxicity Using Aquatic Invertebrate, Daphnia Model Organism *Int. J. Mol. Sci*. 2015, 16(6), 12261-12287.

Kadereit S, Zimmer B, van Thriel C, Hengstler JG, Leist M. Compound selection for in vitro modeling of developmental neurotoxicity. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jun 1;17:2442-60.

Karri V, Ramos D, Martinez JB, Odena A, Oliveira E, Coort SL, Evelo CT, Mariman ECM, Schuhmacher M, Kumar V. Differential protein expression of hippocampal cells associated with heavy metals (Pb, As, and MeHg) neurotoxicity: Deepening into the molecular mechanism of neurodegenerative diseases. *J Proteomics*. 2018, 187:106-125.

Koo Y, Hawkins BT, Yun Y. Three-dimensional (3D) tetra-culture brain on chip platform for organophosphate toxicity screening. *Sci Rep*. 2018, 8(1):2841.

Kools SAE, Van Loon AH, Sjerps RMA, Rosenthal, LPM. De kwaliteit van bronnen van drinkwater in Nederland. KWR rapport 2019, KWR 2017.072.

Legradi JB, Di Paolo C, Kraak MHS, van der Geest HG, Schymanski EL, Williams AJ, Dingemans MML, Massei R, Brack W, Cousin X, Begout ML, van der Oost R, Carion A, Suarez-Ulloa V, Silvestre F, Escher BI, Engwall M, Nilén G, Keiter SH, Pollet D, Waldmann P, Kienle C, Werner I, Haigis AC, Knapen D, Vergauwen L, Spehr M, Schulz W, Busch W, Leuthold D, Scholz S, Vom Berg CM, Basu N, Murphy CA, Lampert A, Kuckelkorn J, Grummt T, Hollert H. An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. *Environ Sci Eur.* 2018, 30(1): 46.

Lein P, Locke P, Goldberg A. Meeting report: Alternatives for developmental neurotoxicity testing – Test-Smart developmental neurotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 2007, 115, 764–768.

Liang X, Zha J. Toxicogenomic applications of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) in aquatic toxicology. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2016, 19:174-180.

Martinovic-Weigelt D, Mehinto AC, Ankley GT, Denslow ND, Barber LB, Lee KE, King RJ, Schoenfuss HL, Schroeder, A L, Villeneuve DL. Transcriptomic Effects-Based Monitoring for Endocrine Active Chemicals: Assessing Relative Contribution of Treated Wastewater to Downstream Pollution. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48(4) 2385–2394.

Martyniuk CJ, Popesku JT, Chown B, Denslow ND, Trudeau VL. Quantitative proteomics in teleost fish: insights and challenges for neuroendocrine and neurotoxicology research. *Gen Comp Endocrinol.* 2012, 176(3):314-320.

Massei R, Hollert H, Krauss M, Von Tümpling, Weidauer C, Haglund P, Küster E, Gallampois C, Tysklind M, Brack, W. Toxicity and neurotoxicity profiling of contaminated sediments from Gulf of Bothnia (Sweden): a multi-endpoint assay with Zebrafish embryos. *Environ Sci Eur.* 2019, 31:8

Meijer M, Hamers T, Westerink RH. Acute disturbance of calcium homeostasis in PC12 cells as a novel mechanism of action for (sub)micromolar concentrations of organophosphate insecticides. *Neurotoxicology* 2014, 43:110-116.

NORMAN, Report on activities of WG-2 on Bioassays. Oral presentation of H. Hollert at NORMAN General Assembly, Milan, 28-29 November 2019.

Nrets, 2008. First upload on en.wikipedia.org, uploaded to Wikimedia Commons as Image:SynapseIllustration2.png, SVG version by User:Surachit. For further information on the image's contents, see Julien, R. M. (2005). The neuron, synaptic transmission, and neurotransmitters. In R. M. Julien, A primer of drug action: A comprehensive guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs (pp. 60-88). New York, NY, USA: Worth Publishers., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4001388>

Ptaszek M. Rational Design of Fluorophores for In Vivo Applications. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2013, 113: 59-108.

Raldua D, Campos B, Barata C, Piña B, García-Reyero N, Babin, P.J. Chapter 17 – Deciphering emerging toxicological effects of pharmaceuticals on aquatic organisms by using *Daphnia magna* and *Danio rerio* as model organisms *Comprehensive Analytical Chemistry* 62: 611-647.

Rand MD. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol Teratol.* 2010, 32(1):74-83.

Rice D, Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.* 2000, 108 (Suppl. 3):511-533.

Ruszkiewicz JA, Pinkas A, Miah MR, Weitz RL, Lawes MJA, Akinyemi AJ, Ijomone OM, Aschner M. *C. elegans* as a model in developmental neurotoxicology. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018, 354:126-135.

Schmidt BZ, Lehmann M, Gutbier S, Nembo E, Noel S, Smirnova L, Forsby A, Hescheler J, Avci HX, Hartung T, Leist M, Kobolák J, Dinnyés A. In vitro acute and developmental neurotoxicity screening: an overview of cellular platforms and high-throughput technical possibilities. *Arch Toxicol.* 2017, 91(1):1-33.

Schriks M, Baken K, Simon E, Besselink H, van der Linden S, Kienle C, van der Burg B, Hebert A. Selection criteria to select in vitro bioassays for implementation and use. DEMEAU deliverable D41.2.

Schultz L, Zurich MG, Culot M, da Costa A, Landry C, Bellwon P, Kristl T, Hörmann K, Ruzek S, Aiche S, Reinert K, Bielow C, Gosselet F, Cecchelli R, Huber CG, Schroeder OH, Gramowski-Voss A, Weiss DG, Bal-Price A. Evaluation of drug-induced neurotoxicity based on metabolomics, proteomics and electrical activity measurements in complementary CNS in vitro models. *Toxicol In Vitro* 2015, 30 (1 Pt A): 138-165.

Shinde V, Klima S, Sureshkumar PS, Meganathan K, Jagtap S, Rempel E, Rahnenführer J, Hengstler JG, Waldmann T, Hescheler J, Leist M, Sachinidis A. Human Pluripotent Stem Cell Based Developmental Toxicity Assays for Chemical Safety Screening and Systems Biology Data Generation. *J Vis Exp.* 2015 17;(100):e52333. doi: 10.3791/52333.

Smirnova L, Hogberg HT, Leist M, Hartung T. Developmental neurotoxicity - challenges in the 21st century and in vitro opportunities. *ALTEX.* 2014;31(2):129-56. doi: 10.14573/altex.1403271.

Soong, R.a, Nagato, E.a, Sutrisno, A.a, Fortier-McGill, B.a, Akhter, M.a,b, Schmidt, S.c, Heumann, H.c, Simpson, A.J.a,b In vivo NMR spectroscopy: Toward real time monitoring of environmental stress Magnetic Resonance in Chemistry 2015, 53(9): 774-779.

Spaan K, Haigis AC, Weiss J, Legradi J. Effects of 25 thyroid hormone disruptors on zebrafish embryos: A literature review of potential biomarkers. *Sci Total Environ.* 2019, 656:1238-1249.

Taylor NS, Weber RJM, White TA, Viant MR. Discriminating between different acute chemical toxicities via changes in the daphnid metabolome. *Toxicological Sciences* 2010, 118(1): 307-317.

Theunissen PT, Robinson JF, Pennings JL, van Herwijnen MH, Kleinjans JC, Piersma AH. Compound-specific effects of diverse neurodevelopmental toxicants on global gene expression in the neural embryonic stem cell test (ESTn). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012, 262(3): 330-340.

Vandenbrouck, T., Jones, O.A.H., Dom, N., Griffin, J.L., De Coen, W. Mixtures of similarly acting compounds in *Daphnia magna*: From gene to metabolite and beyond. *Environment International* 2010, 36(3): 254-268.

Van der Oost R, Sileno G, Suárez-Muñoz M, Nguyen MT, Besselink H, Brouwer A. SIMONI (smart integrated monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part i-model design and effect-based trigger values. *Environ Toxicol Chem.* 2017, 36(9):2385-2399.

Xia P, Zhang X, Zhang H, Wang P, Tian M, Yu H. Benchmarking Water Quality from Wastewater to Drinking Waters Using Reduced Transcriptome of Human Cells. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51(16): 9318–9326.

Wernersson, A., Carere, M., Maggi, C. et al. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ Sci Eur* 2015, 27:7.

Zwart N, Lamoree MH, Houtman CJ, de Boer J, Kool J, Hamers T. Development of a luminescent mutagenicity test for high-throughput screening of aquatic samples. *Toxicol In Vitro* 2018a, 46: 350-360.

Zwart N, Nio SL, Houtman CJ, de Boer J, Kool J, Hamers T, Lamoree MH. High-Throughput Effect-Directed Analysis Using Downscaled in Vitro Reporter Gene Assays To Identify Endocrine Disruptors in Surface Water. *Environ Sci Technol.* 2018b 52(7):4 367-4377.

Zwartsen A, Hondebrink L, Westerink RH. Changes in neuronal activity in rat primary cortical cultures induced by illicit drugs and new psychoactive substances (NPS) following prolonged exposure and washout to mimic human exposure scenarios. 2019a. *Neurotoxicology* 74:28-39.

Zwartsen A, Litjens CHC, Hondebrink L, van den Heuvel JJMW, Greupink R, Russel FGM, de Lange DW, Legler J, Koenderink JB, Westerink RHS. 2019b. Differential effects of psychoactive substances on human wildtype and polymorphic T356M dopamine transporters (DAT). *Toxicology*. 2019b 15;422:69-75.