

1 Einleitung

Schon seit Beginn der 90iger Jahre liefert die zunehmende Verschmutzung der Umwelt mit hormonähnlich wirkenden Chemikalien immer wieder Stoff für die Presse. Meldungen, wie sie beispielsweise am 25. Januar 1994 in der Washington Post zu lesen waren, „In Florida, a wildlife biologist wonders why alligator eggs failed to hatch, and why so many male alligators have abnormally small phalluses“, häuften sich und die Medien fragten mehr und mehr nach den Ursachen der beobachteten Effekte: „Are some pollutants a threat to fertility?“. Waren es wirklich die Umweltgifte, die die beobachteten Veränderungen ausgelöst hatten? Im Fall der Alligatoren Floridas ließ sich nach experimentellen Studien (Vos et al., 2000) schnell eine Antwort auf diese Frage finden, und tatsächlich waren die hohen DDT-Konzentrationen im Oberflächenwasser des Lake Apoka für die missgebildeten Hoden, die verkleinerten Penisse und die verringerten Testosteronwerte im Plasma verantwortlich (Guillette et al., 1994, 1996).

Das DDT war durch einen Unfall mit dem Insektizid DicofolTM in den See gelangt. Aber nicht allein die Tatsache, dass auch bei zahlreichen anderen Wildtieren, immer wieder Abnahmen der Fertilität und zunehmende Verweiblichungen beobachtet werden konnten (Purdom et al., 1994; Guillette et al., 1994; Facemire et al., 1995; Toppari et al., 1996) - so fand man bei Fischen vermehrt Geschlechtsumkehr, bei Panthern eine Häufung von Kryptorchismus und bei Vögeln verdünnte Eihüllen und verändertes Sexualverhalten (Colborn und Clement, 1992; Colborn et al., 1993; Davis et al., 1993; Guillette et al., 1995; Toppari et al., 1996) - machte die Medien auf die Verschmutzung der Umwelt mit hormonähnlich wirkenden Stoffen aufmerksam. Vielmehr war es vor allem der Umstand, dass auch bei Menschen zunehmend Einschränkungen in der Fruchtbarkeit zu erkennen waren, der das Interesse der Öffentlichkeit erregte. Vor allem Männer, so schien es, waren von der Umweltbelastung durch estrogen wirkende Stoffe bedroht, wie man einem Bericht der Newsweek (1994) entnehmen konnte: „Sperm counts down? Penises shriveled? Hey, Rush, don't blame it on feminists. It may be from chemical pollutants in water and food“.

Die Newsweek reagierte mit diesen Worten wie viele andere Zeitungen auf eine der zahlreichen Erhebungen, in denen Spermienmengen gesunder Männer in den letzten Jahrzehnten verglichen wurden. Eine dieser Studien, durchgeführt von einer dänischen Forschergruppe, beschrieb im British Medical Journal (1992) nach einer internationalen Erhebung die signifikante Abnahme der Spermienkonzentration im Ejakulat der Männer in den Jahren 1938 – 1990 (Carlsen et al., 1992). Die Forscher kamen zu dem Schluss, dass wahrscheinlich vor allem die fetale Belastung gegenüber estrogenen oder estrogenähnlichen Substanzen ein Risikofaktor für die zunehmende Verminderung der Reproduktionsfähigkeit darstellt (Carlsen et al., 1992; Toppari et al., 1995). Aber nicht nur hinter der Abnahme der Fertilität gesunder Männer vermutete man die Xenoestrogene, vielmehr sollten sie auch für die Zunahme von

Hoden- und Brustkrebs gerade bei jungen Menschen und einer Reihe weiterer Erkrankungen der Geschlechtsorgane wie Kryptorchismus und Hypospadie verantwortlich sein (Toppari et al., 1996). Gesicherte Daten über die Beteiligung estrogenen Umweltschadstoffe an den bei Menschen beobachteten Effekten liegen jedoch bislang noch nicht vor und viele der von Toppari et al. (1996) zusammengefassten Studien werden angezweifelt. Trotzdem führte die Hypothese über die Beteiligung von Umweltschadstoffen am Rückgang der Spermienzahlen zu einer Flut von Untersuchungen (Safe, 2000). Diese hatten in erster Linie das Ziel, das estrogen Potential verdächtiger Umweltchemikalien zu untersuchen und Testverfahren zur Bewertung der Estrogenizität neuer Substanzen zu entwickeln (Reel et al., 1996; Zacharewski, 1997).

Vor allem mit Hilfe des „E-Screen“, einem Test, bei dem die proliferationsfördernde Wirkung einer Substanz in der estrogen-sensitiven Brustkrebszelllinie MCF-7 mit der von 17β -Estradiol (E2) verglichen wird, gelang es eine Reihe von Xenoestrogenen zu identifizieren (Ankley et al., 1998; Degani et al., 1999). Unter anderem konnte das estrogen Potential zahlreicher Pestizide wie Lindan, Atrazin, Tributylzinn, Endosulfan und PCBs, Plastikweichmacher wie Phtalate, Schwermetalle wie Cadmium und Detergenzien wie Alkylphenolpolyethoxylate nachgewiesen werden (Soto et al., 1991; Routledge und Sumpter, 1997; Andersson et al., 1999). Alkylphenolpolyethoxylate werden bei der Herstellung von Reinigungsmitteln, Plastik, Papier und Kosmetika verwendet und gelangen als nichttoxische, hydrophile Komponenten mit nur schwacher estrogener Aktivität ins Abwasser (Gronen et al., 1999). Dort werden sie von Bakterien in die weit bioaktiveren Alkylphenole, zu denen *p*-Nonylphenol und *4-tert*-Octylphenol gehören, abgebaut. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften reichern sich die Alkylphenole in Tieren an (Ekelund et al., 1990; Ahel und Giger, 1993; Ahel et al., 1993). Aber auch im Sediment der Flüsse und Seen (Ekelund et al., 1990; Ahel et al., 1994a, b, c; Jobling et al., 1996) können sie gerade in Europa in großen Mengen nachgewiesen werden (Giger et al., 1984; Soto et al., 1991; Jobling und Sumpter, 1993; Sumpter und Jobling, 1995; Nimrod und Benson, 1996; Jobling et al., 1996).

Wahrscheinlich war es auch die hohe Kontamination mit Nonylphenol, dem wohl häufigsten Alkylphenol, die bei zahlreichen Fischen in der Nähe britischer Kläranlagen zu einem vermehrten Auftreten von Mischgonaden und verkleinerten Hoden geführt hatte (Harries et al., 1997). Eine durch Nonylphenol hervorgerufene Induktion der estrogen-regulierten Vitellogeninsynthese in männlichen Fischen ist jedenfalls anhand zahlreicher *In vitro*- und *In vivo*-Tests belegt (Soto et al., 1991; Jobling und Sumpter, 1993; Purdom et al., 1994; Desbrow et al., 1996; Jobling et al., 1996; Lech et al., 1996; Nimrod und Benson, 1996; Ren et al., 1996 a, b; Madsen et al., 1997; Christiansen et al., 1998a, b; Korsgaard und Pedersen, 1998; Bechmann, 1999; Christensen et al., 1999; Miles-Richardson et al., 1999a, b; Kinnberg et al., 2000).

Vitellogenin, das Dottervorläuferprotein oviparer Vertebraten, kommt unter normalen Umständen ausschließlich bei geschlechtsreifen Weibchen vor. Von der Leber, als Antwort auf

im Kreislauf zirkulierendes Estrogen produziert, gelangt es über das Blut zu den Ovarien, wo es über Pinocytose in die Oocyten aufgenommen und in die Dotterproteine Phosphitin und Vitellin gespaltet wird (Wahli et al., 1981; Tyler et al., 1988; Specker und Sullivan, 1993; Buerano et al., 1995; Sumpter und Jobling, 1995). Bei Männchen und unreifen Weibchen ist Vitellogenin normalerweise nicht nachweisbar, kann aber durch künstliche Stimulation wie die Injektion oder Fütterung von (Xeno-)estrogenen und die Exposition über das Wasser induziert werden (Wangh und Knowland, 1975; Emmersen und Petersen, 1976; Knowland, 1978; De Vlaming et al., 1980; Maitre et al., 1986; Peyon et al., 1993; Purdom et al., 1994; Celius und Walther, 1998). Nach Induktion der Vitellogeninsynthese ist das Protein im Plasma nachweisbar (Emmersen und Petersen, 1976; Knowland, 1978; Medda et al., 1980; De Vlaming et al., 1980; Sundararaj und Nath, 1981; Ruby et al., 1987; Bradley und Grizzle, 1989; Kishida et al., 1992; Folmar et al., 1996; Arukwe et al., 1998; Sherry et al., 1999), kann aber auch mit Hilfe immunhistochemischer bzw. immunocytochemischer Methoden bereits an seinem Syntheseort, der Leber, sichtbar gemacht werden. Die Sensitivität dieser Methode erlaubt eine sehr frühe Erkennung einer estrogen wirksamen Substanz (Wahli et al., 1998; Bieberstein et al., 1999).

In vitro-Studien wie die Untersuchung der Vitellogeninsyntheseinduktion, hervorgerufen durch Xenoestrogene in männlichen oviparen Vertebraten und der E-Screen-Assay bieten die Möglichkeit, Verdachtsstoffe schnell zu überprüfen (Screening) und erlauben somit eine Bewertung der hormonellen Aktivität (Welshons et al., 1990; Mayr et al., 1992; Soto et al., 1992, 1994). Weiterhin eignen sie sich für die Untersuchung der Wirkmechanismen estrogenen Substanzen (Degen et al., 1999). Für die Bewertung weiterreichender Effekte wie die von Harries et al. (1997) an Fischen beobachteten Mischgonaden reichen diese Tests allerdings nicht aus. Zwar kann auch der *In vivo*-Test an Einzeltieren noch keine endgültige Erklärung für im Freiland auftretende Effekte liefern, doch erweist er sich gerade im Hinblick auf die Bewertung der relativen Wirkungsstärke und der Pharmakokinetik einer Substanz als unverzichtbar (Kavlock et al., 1996). Am deutlichsten wird dieser Umstand beim Vergleich der *In vivo*- und *In vitro*-Daten von DDT. Während sich im „E-Screen“ an MCF-7 Zellen eine relative Wirkstärke von 0,000001 im Vergleich zu 17 β -Estradiol ermitteln ließ (Soto et al., 1992, 1994), erwies sich DDT im *In vivo*-Assay an Ratten nur noch um 4 Zehnerpotenzen schwächer als 17 β -Estradiol (Cecil et al., 1971; Hammond et al., 1979). Verantwortlich für die starken Unterschiede ist vermutlich die langsame Eliminierung des lipophilen DDT aus dem lebenden Tier (Degen et al., 1999).

Für die ebenfalls sehr lipophilen Alkylphenole liegen einige *In vivo*-Studien vor, die anhand der histologischen Befunde bereits in die Richtung der im Freiland beobachteten Effekte weisen. Beispielsweise konnten Miles-Richardson et al. (1999a) in ihrer Studie nach 42tägiger kontinuierlicher Nonylphenolexposition (bis 10 μ g/L) eine Veränderung der Hoden und der sekundären Geschlechtsmerkmale von männlichen geschlechtsreifen Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) nachweisen. Auch Christiansen et al. (1998a) beschreiben eine veränderte

Hodenstruktur und Hodenzellzusammensetzung bei Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) nach Nonylphenol- und 17β -Estradiol-Injektion. Veränderungen der Ovarien weiblicher Fische wie eine veränderte Oocytenzusammensetzung, Degenerationserscheinungen der Eizellen oder das Auftreten von Ovotestes sind in diesen Studien allerdings nicht beschrieben. Untersuchungen mit Octylphenol, einem weiteren Alkylphenol, belegen allerdings das Auftreten von Mischgonaden nach kontinuierlicher Exposition von Medakas gegenüber $100 \mu\text{g/L}$ Octylphenol bis zu einem Zeitpunkt von 3 Monaten nach Schlupf (Gray et al., 1999). Neben den Ovotestes fielen in dieser Studie weitere histologische Veränderungen, beispielsweise das hohe Vorkommen von Atresie auf.

Atresie kann zwar als Antwort auf die toxische Wirkung beobachtet werden (Dierschke et al., 1994), beispielsweise nach Phenol-Exposition von Zebrafischen (Razani et al., 1986), sie tritt aber vor allem nach Exposition gegenüber hormonell aktiven Stoffen wie einigen PCBs, Carbofuranen und 17β -Estradiol auf (Olsson et al., 1999; Sukumar und Karpagaganapathy, 1992). Bei Säugetieren gilt 17β -Estradiol als Hauptauslöser follikulärer Atresie (Dierschke et al., 1994). Neben einer erhöhten Rate atretischer Follikel werden auch eine Reihe weiterer Veränderungen der Ovarien der Wirkung endokrin aktiver Stoffe zugeschrieben, wie beispielsweise die Verringerung der Anzahl reifer Follikel (Sukumar und Karpagaganapathy, 1992) oder die Zunahme primärer Follikel (Miles-Richardson et al., 1999b).

Ausgelöst werden diese Effekte vermutlich durch den Mangel an endogenem Gonadotropin (Pawer und Katdare, 1983) bzw. dem fehlenden Anstieg von GtH-II (Myelonas et al., 1997a). Auch wenn histologische Veränderungen der Gonaden zu einer signifikanten Verringerung der Fruchtbarkeit von Einzeltieren führen können (Giesy et al., 2000; Taylor et al., 1999), ist ihre Relevanz für eine Population noch nicht geklärt.

Bislang sind aus der Geschichte der Xenoestrogenforschung nur wenige Fälle bekannt, bei denen der Rückgang einer Population sicher der Wirkung eines Stoffes zugeordnet werden kann. Vor allem wird aus den bekannten Fällen deutlich, dass eine Reihe von Faktoren die Population beeinträchtigen können. Beispielsweise kann die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses, wie sie bei einer marinen Gastropodenpopulation durch Tributylzinn (TBT) hervorgerufen beobachtet werden konnte, Folgen für die Population haben. Bei den Gastropoden war eine Maskulinisierung (Imposex) durch das als Biozid in Antifouling-Anstrichen von Schiffen verwendete TBT erkennbar (Gibbs und Bryan, 1994; Langston, 1996; Taylor et al., 1999). Zu einem Rückgang der Population kann es aber auch durch die Sterilität der Individuen kommen, wie im Fall der Ringelrobbe (*Phoca hispida*) und Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) der Ostsee gezeigt werden konnte. Bei diesen Tieren konnte, ausgelöst durch die Anreicherung von PCBs und DDT im Körper, neben den pathologischen Veränderungen der Reproduktionsorgane und der damit verbundenen Sterilität, auch das Auftreten krankhafter Funktionsstörungen wie Osteoporose dokumentiert werden (Jensen und Jansson, 1976; Bergman und Olsson, 1985; Haraguchi et al., 1992; Bergman et al., 1994; Olsson et al., 1994). Ein weiterer Aspekt, der zu einer Bedrohung für den Fortbestand einer Population werden kann,

ist die Schädigung der Nachkommen belasteter Tiere, wie sie vor allem bei zahlreichen Freilandpopulationen von Vögeln gezeigt werden konnte. So führte beispielsweise die durch DDE ausgelöste Eischalen-Verdünnung und das damit verbundene Zerschlagen der Eier zu einer verminderten Populationsstärke bei zahlreichen Vogelarten (Vos et al., 2000). Das Auftreten verdünnter Eischalen konnte mehrfach z. B. bei Weißkopfschneepfaffen (*Haliaeetus leucocephalus*) dokumentiert werden (Lincer, 1975; Peakall et al., 1973; Ratcliffe, 1970). Ausgelöst durch hohe DDT-Konzentrationen fielen bei Vögeln auch andere reproduktive Beeinträchtigungen auf. Beobachtet werden konnten neben hohen Mortalitäten bei Embryonen und Küken, Ödeme, Wachstumsverzögerungen und Missbildungen, vor allem Veränderungen des Brutverhaltens, die in einer Verringerung des Schlupferfolges resultierten (Vos et al., 2000).

Es ist also zweifellos von besonderer Wichtigkeit, die Wirkung hormonell aktiver Stoffe auf dem Niveau der Population zu untersuchen (Taylor et al., 1999). Nach einer von Taylor et al. (1999) niedergeschriebenen Empfehlung sollen zunächst Langzeittests durchgeführt werden. Die bei diesen Tests ermittelten Daten können dann helfen, besser von an Individuen beobachteten Befunden auf populationsrelevante Effekte zu schließen. Neben chemischen Analysen sollen in den Langzeitversuchen vor allem Biomarker gemessen und der reproduktive Erfolg wie Fruchtbarkeit, Schlupferfolg und Geschlechterverhältnis abgeklärt werden (Taylor et al., 1999). Notwendige Voraussetzung für die Zuverlässigkeit der Daten aus experimentellen Langzeituntersuchungen ist, dass artabhängige Unterschiede in der Sensitivität und sogenannte „kritische Fenster“ beachtet werden (Guillette et al., 1995; Taylor et al., 1999). Sind die sensiblen Phasen der Entwicklung eines Organismus nicht bekannt, bietet es sich an, Life-Cycle-Experimente durchzuführen. Durch die Wahl geeigneter Monitororganismen wie dem Zebraquarienfisch für das aquatische System können innerhalb weniger Monate fundierte Aussagen über die Wirkung einer Substanz getroffen werden.

Life-Cycle-Experimente haben weiterhin den Vorteil, dass bereits in der Embryonal- und Larvalentwicklung auftretende Veränderungen eines Organismus durch ein Toxin oder Xenoestrogen erfasst werden können. Embryonal- und Larvalstadium gelten als sensibelste Phasen der Entwicklung (Pickering und Gast, 1972; McKim et al., 1975; McKim, 1977; Van Leeuwen et al., 1985; Suter et al., 1987; McMaster et al., 1992; Samson und Shenker, 2000; Villalobos et al., 2000). Bei der Bewertung der hinter diesen Veränderungen stehenden Mechanismen ergeben sich allerdings zahlreiche Schwierigkeiten. Verspäteter oder verfrühter Schlupf der Larve, das Entstehen von Ödemen und Wirbelsäulenanomalien oder die Veränderungen des Blutflusses sind zwar Anzeichen der Störung des endokrinen Gleichgewichtes (Ahlen, 1999, Olsson et al., 1999), sie treten aber auch als toxische Reaktionen auf (Henry et al., 1997; Goka, 1999; Gray und Metcalfe, 1999; Kim und Cooper, 1999; Strmac und Braunbeck, 1999; Wright und Tillitt, 1999; Samson und Shenker, 2000; Villalobos et al., 2000). Aber nicht allein die direkte Belastung der Eier sondern vielmehr die indirekte Belastung über die Eltern führt meist zu schweren Beeinträchtigungen der Embryonal- und Larvalentwicklung. Vor allem nach Behandlung der Mütter mit hormonell aktiven Stoffen, lässt sich unter

anderem eine höhere Ei- und Larven-Mortalität und ein erhöhtes Auftreten von Deformationen dokumentieren (Lethinen et al., 1999). Missbildungen im hinteren Körperabschnitt der Larven und Ödeme waren nach 17β -Estradiol- und PCB-Behandlung von Zebrabärblingsmüttern zu beobachten (Billsson et al., 1998).

Die Exposition gegenüber hormonell aktiven Substanzen wirkt sich oft nicht allein oder gar nicht in der Embryonal- und Larvalphase aus. Vielmehr treten vor allem bei adulten Tieren Effekte auf, die sich auf eine Belastung in den frühen Lebensphasen der Fische zurückführen lassen. Zwar konnten Olsson et al. (1999) eine erhöhte Mortalität bei PCB- und 17β -Estradiol-belasteten Zebrabärblingslarven beobachten, doch zeigten sich weitere Beeinträchtigungen erst bei den heranwachsenden und geschlechtsreifen Tieren. Neben Schädigungen der Gonaden wie vermehrt auftretender Atresie in den Ovarien und einem Ausbleiben der Spermio-genese in den Hoden, waren vor allem Veränderungen der Morphologie der Fische zu beobachten. Sowohl PCB als auch 17β -Estradiol führten zu craniofacialen Missbildungen; nach PCB-Belastung fiel zusätzlich das Auftreten von Lordose bei den Weibchen und Skoliose bei beiden Geschlechtern auf (Olsson et al., 1999).

In den meisten Fällen lässt sich der Einfluss, in den frühen Lebensphasen wirkender hormonell aktiver Stoffe ausschließlich an adulten, geschlechtsreifen Tieren erkennen. So treten beispielsweise häufig Veränderungen des Gewichtes nach embryonaler und larvaler Behandlung mit einem „endocrine disrupter“ (endokrin wirkende Chemikalien) auf. Beispielsweise beschreiben Ashfield et al. (1998) Gewichtsveränderungen an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) u. a. durch die Behandlung mit Nonylphenol und Octylphenol während der ersten Monate nach dem Schlupf. Beeinflussungen des Gewichtes durch die Gabe von 17β -Estradiol sind aus zahlreichen Studien bekannt (Johnstone et al., 1978; Blázquez et al., 1998; Åkerblom et al., 2000).

Die wohl deutlichste Antwort auf die in frühen Lebensstadien wirkenden hormonell aktiven Stoffe kennt man aus dem Bereich der Aquakultur. Hier gelingt es, beispielsweise durch den Einsatz von 17β -Estradiol, selbst aus genetisch eindeutig determinierten Männchen Weibchen zu züchten (Egami, 1955a, b; Yamamoto, 1958, 1969, Chatain et al., 1999).

1.1 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Studie untergliedert sich in zwei wesentliche Teilaspekte.

- A. Die Etablierung einer immunhistochemischen Methode zum Nachweis von Vitellogenin in der Leber von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*).
- B. Die Untersuchung des Einflusses von Nonylphenol, Octylphenol und DHEA auf eine Zebrabärblingspopulation (*Danio rerio*) bei kontinuierlicher, lebenslanger Belastung ab Ei im Durchflusssystem.

A. Etablierung einer immunhistochemischen Methode zum Nachweis von Vitellogenin in der Leber von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

Für die quantitative Untersuchung der Vitellogenininduktion im Plasma von Fischen und anderen oviparen Vertebraten stehen Methoden wie beispielsweise der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zur Verfügung. Voraussetzung für die Durchführung dieser Versuch ist das Vorhandensein einer großen Blutmenge. Gerade bei kleinen Vertebraten wie dem Zebrafisch ist es aber ein Problem, ausreichend Blut zur Verfügung zu stellen, so dass oft Pools von Proben aus mehreren Tiere angelegt werden müssen. In der vorliegenden Studie sollte die Tauglichkeit der Immunhistochemie als Alternative für den Nachweis von Vitellogenin getestet werden. Immunhistochemische Methoden werden heute in zahlreichen Bereichen der Biologie und Medizin eingesetzt, beispielsweise der Diagnostik und Therapie von Krebs (DeLellis und Kwan, 1988). Auch wenn die Möglichkeiten der Quantifizierung bei dieser Methode limitiert sind (Van Veld et al., 1997), können wertvolle Informationen über Synthesorte, Verteilung und Transport innerhalb der Gewebe gewonnen werden.

Mit Hilfe der vorliegenden Untersuchungen sollten folgende Punkte abgeklärt werden:

1. Modifikation und Optimierung der immunhistochemischen Technik zum Nachweis von Vitellogenin in der Leber der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*).
2. Test des vorhandenen polyklonalen Antikörpers gegen Regenbogenforellenvitellogenin auf die Einsatzfähigkeit bei der Detektion des Proteins in der Leber.
3. Überprüfung der Sensitivität der Methode beim Auffinden von Vitellogenin bei induzierten männlichen Regenbogenforellen.
4. Bewertung der Vitellogeninpräsenz in den Leberparenchymzellen.
5. Untersuchung des Vitellogeningehalts von weiteren Organen der Regenbogenforelle, z. B. den Ovarien.
6. Identifikation der zellulären Vitellogenin-enthaltenden Kompartimente.

Zur Optimierung der immunhistochemischen Technik wurden folgende Experimente durchgeführt:

1. Untersuchung unterschiedlicher Fixierungen und Einbettungen.
2. Untersuchung der optimalen Aufreinigungsbedingungen des Antikörpers in Zusammenarbeit mit Markus Islinger.
3. Variation der Inkubationszeiten, Antikörperkonzentrationen und Inkubationsbedingungen an vitellogeninproduzierenden Regenbogenforellenweibchen.
4. Verbesserung der Visualisierung der immunologischen Reaktionsprodukte.

B. *In vivo*-Langzeituntersuchung mit Nonylphenol, Octylphenol und Dehydroepiandrosteron (DHEA)

Mit Hilfe von Life-Cycle-Versuchen sollte ein möglichst vielschichtiges Bild über die Wirkungsweise der Alkylphenole Nonylphenol und Octylphenol sowie DHEA erhalten werden. Ziel war es, Daten zur Verfügung zu stellen, die bei einer Verifizierung der bereits zahlreich vorhandenen *In vitro*-Befunde helfen können. Weiterhin sollten die an den künstlichen Populationen erhobenen Parameter dazu dienen, im Freiland auftretende Effekte besser bewerten und die Folgen für natürliche Populationen besser abschätzen zu können.

Bedingt durch die Art der Exposition ließen sich in den Versuchen mehrere Phasen unterscheiden:

1. Embryonal- bis frühe Larvalphase
2. Späte Larvalphase bis frühe Juvenilphase
3. Späte Juvenilphase bis Adultphase

Embryonal-, Larval- und frühe Juvenilphase gelten als sensitivste Stadien der Entwicklung (McKim, 1977). Umweltschadstoffe können gerade während dieser Lebensabschnitte weitreichende Störungen verursachen, die direkt zu beobachten sind oder sich erst später bei adulten geschlechtsreifen Tieren manifestieren (Yokota et al., 2000). Treten während den frühen Lebensphasen Schädigungen durch hormonell aktive Stoffe auf, äußern sich diese meist in ähnlicher Weise wie Veränderungen, die durch rein toxisch wirkende Stoffe ausgelöst werden (Kime, 1999). Um solche Schädigungen bereits innerhalb der ersten Lebenstage und -wochen der Zebrabärblinge zu erfassen, wurden die während diese Zeit noch unter statischen Bedingungen gehaltenen Tiere ständig im Hinblick auf entwicklungsrelevante Parameter wie Pigmentierung, Anlage von Somiten und Augen, Schlupfzeitpunkt, Missbildungen und Mortalität untersucht.

Tiere, die keinerlei weitreichende Schädigungen hatten, wurden in die Durchflussanlage umgesiedelt. In dieser dritten und letzten Versuchsphase sollte vor allem ein Heranwachsen unter

stets gleich bleibenden Bedingungen gewährleistet sein. Nach Erreichen der Geschlechtsreife, das in Abhängigkeit von Dichte und Fütterung in den einzelnen Versuchen variierte, sollten Reproduktionsversuche eine Einschätzung über die Reproduktionsfähigkeit der belasteten Tiere ermöglichen. Von großer Bedeutung schien zunächst, ob die Tiere überhaupt zu einer erfolgreichen Reproduktion in der Lage waren, und wenn ja, mit welcher Häufigkeit und welchem Erfolg. War bei den ausgesuchten Brutpaaren eine Eiablage zu beobachten, sollte ein Vergleich der Eizahlen und Befruchtungsraten belasteter und unbelasteter Fische Aufschluss über eventuelle Schädigungen geben. Aber nicht allein der Erfolg, befruchtete Eier zu produzieren, garantiert das Überlebender einer Population, vielmehr muss auch die Lebensfähigkeit der Nachkommen gewährleistet sein. Aus diesem Grund wurde bei einem Teil der aus belasteten Eltern hervorgegangenen Embryonen die weitere Entwicklung über einen Zeitraum von mindestens einer Woche ohne weitere Schadstoffgabe erfasst. Zur Überprüfung, inwieweit eine weitere Belastung bei den Tieren der F₂-Generation eine zusätzliche Schädigung bewirken kann, wurden einige Eier und Larven mit den gleichen Schadstoffkonzentrationen weiter behandelt, denen zuvor die Elterntiere ausgesetzt waren.

Da durch den Einfluss von estrogen aktiven Stoffen mit einer Schädigung der Eier und Spermien zu rechnen ist (Kime, 1999), wurden nach Beendigung der Life-Cycle-Versuche jeweils eine definierte Anzahl der belasteten und unbelasteten Tiere histologisch untersucht. Hierbei wurde bei den Weibchen besonderes Gewicht auf die Oocytenreifung, bei den Männchen auf die Spermatogenesestadien gelegt (siehe hierzu Kap. 3.2.2.9 Exkurs: Anatomie und Histologie von Ovar und Hoden des Zebrafisch (*Danio rerio*)).

Zusätzlich wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, da sich in zahlreichen Studien cytologische und ultrastrukturelle Veränderungen als sensitive Parameter zum Nachweis von Schadstoffbelastungen und umweltinduziertem Stress bewährt haben (Braunbeck, 1989, 1992a, b; Oulmi et al., 1995, Braunbeck und Völkl, 1991; Burkhardt-Holm et al., 1990). Auch bei der Bewertung der durch die estrogen Aktivität ausgelösten Veränderungen hat sich diese Technik als hilfreich erwiesen (Peute et al., 1978, 1985).

