

3.2 Der Einfluss von Nonylphenol auf den Zebraärbling (*Danio rerio*)

Zusammenfassung: Um die Wirkung von Nonylphenol auf eine Population zu untersuchen, wurden Zebraärblinge ab Ei über ihr gesamtes Leben mit der Chemikalie belastet. Der Test begann mit befruchteten Eier und endete mit adulten reproduzierenden Fischen. Um sowohl das endokrine als auch ein möglicherweise toxisches Potential von Nonylphenol erfassen zu können, wurden während des Versuches eine Reihe von Parametern erhoben, die in Abbildung 3.2.1 dargestellt sind. Bereits nach einwöchiger Belastung konnten geringfügige teratogene Effekte bei bis zu 9 Versuchstieren dokumentiert werden. Beeinträchtigungen der Reproduktionsfähigkeit zeigten sich nach Erreichen der Geschlechtsreife unter kontinuierlicher Nonylphenol-Belastung im Durchflusssystem. Neben Veränderungen des Verhaltens fiel in dosisabhängiger Weise vor allem ein Rückgang der Eizahlen und Befruchtungsraten auf. Weiterhin waren nach Aufzucht der unbelasteten Nachkommen Nonylphenol-belasteter Eltern zahlreiche Entwicklungsanomalien, wie verspäteter Schlupf, Ödeme, Augenschäden und Wirbelsäulenverkrümmungen, dokumentierbar. Die anschließende histologische Aufarbeitung der Reproduktionsorgane zeigte eine Schädigung der Ovarien und Hoden. Die Hoden der gegenüber 100 µg/L Nonylphenol exponierten Zebraärblinge fielen einerseits durch die prall mit Spermien angefüllten Tubuli, wie sie bereits ab der Belastung mit 2 µg/L Nonylphenol dokumentiert werden konnten, und andererseits durch das vollständige Fehlen von Spermien verbunden mit einer Zunahme von Spermatogonien auf. Auch in den Ovarien der mit 100 µg/L Nonylphenol behandelten Fische konnte das Fehlen von Oocyten der letzten Reifestufe neben dem Auftreten stark degenerierter, atretischer Follikel dokumentiert werden. In den Lebern der Versuchstiere zeigten sich nach ultrastruktureller Untersuchung Veränderungen vor allem des in die Proteinsynthese involvierten Golgi-Apparates und des rauhen endoplasmatischen Retikulums. Aber auch bei der Verteilung der Reservestoffe innerhalb der Hepatocyten fielen Unterschiede zu den Kontrolltieren auf. Die anatomische Aufarbeitung der Versuchstiere verdeutlichte die Veränderungen skeletaler Elemente.

Neben den histologischen, ultrastrukturellen und anatomischen Befunden konnte unter dem Einfluss von Nonylphenol eine zunehmende Geschlechterverschiebung zugunsten der Weibchen in dosisabhängiger Weise beschrieben werden. Das Gesamtbild der Ergebnisse zeigte die durch Nonylphenol ausgelöste Beeinflussung auf verschiedenen Populations-relevanten Ebenen durch die Bewertung funktioneller und morphologischer Parameter.

3.2.1 Nonylphenol – eine Substanz mit hormonähnlicher Wirkung?

Nonylphenol ist ein Abbauprodukt der Nonylphenol-Polyethoxylate, die in zahlreichen Ländern als Zusatz von Industrieemulgatoren, Detergenzien, Dispersionsmitteln, Emulgatoren und Kunststoffweichmachern eingesetzt werden und früher auch in konventionellen Waschmitteln vorhanden waren. Allein in den USA wurden 1992 225000 t Nonylphenol-Polyethoxylate hergestellt (Naylor et al., 1992). Das biologisch weit wichtigere Abbauprodukt Nonylphenol entsteht durch mikrobielle Zersetzung der Ursprungssubstanz, die über Kläranlagen ins Wasser gelangt (Giger et al., 1984; Ahel et al., 1994; Blackburn und Waldock, 1995). Nonylphenol ist lipophil und hat die Tendenz sich im Ökosystem, vor allem auch in aquatischen Organismen anzureichern (Ekelund et al., 1990; Ahel et al., 1993); in besonders hohen Konzentrationen, mit zum Teil 0,45 – 2,53 g/kg Trockenmasse, ist es vor allem im Klärschlamm und im Sediment der Flüsse zu finden (Naylor et al., 1992; Jobling et al., 1996).

Nonylphenol steht (neben anderen Alkylphenolen) im Verdacht, ähnlich wie das weibliche Hormon 17 β -Estradiol über eine Estrogenrezeptor-vermittelte Reaktion zu wirken. In zahlreichen *In vivo*- und *In vitro*- Studien an Säugetieren, Vögeln und Fischen konnte die estrogene Wirkung von Nonylphenol durch Untersuchung von Biomarkern wie der Induktion der Vitellogeninsynthese in männlichen Tieren gezeigt werden (Jobling und Sumpter, 1993; Jobling et al., 1996; Christiansen et al., 1998a, b).

Nahezu unbekannt sind bislang jedoch die Langzeiteffekte vieler Xenoestrogene, wie die Störungen der Fortpflanzungsfähigkeit und daraus folgend die Schädigungen gesamter Populationen. Eine Verminderung des Reproduktionserfolges kann sich unter anderem aus dem verspätetem Einsetzen oder dem vollständigen Ausbleiben der Geschlechtsreife ergeben. Bei geschlechtsreifen Tieren ist eine Beeinträchtigung der Paarbildung sowie die Änderung oder das vollständige Ausbleiben des Balzverhaltens denkbar. Kommen die Tiere zur Reproduktion, können Verminderung von Anzahl und Qualität der produzierten Eier, sowie Störungen in der Entwicklung von Embryo und Larve für die Population von nachhaltiger Bedeutung sein (Donaldson und Scherer, 1983).

Zur umfassenden Untersuchung der oben genannten Parameter bieten sich Life-Cycle-Versuche an, in denen alle Lebensstadien unter kontinuierlicher Belastung durch das Xenoestrogen beobachtet werden können. Besonders geeignet für diese Versuche sind Organismen, die sehr kurze Generationszeiten haben und deren Haltung und Fortpflanzung unter einfachen Bedingungen möglich ist. Ein solcher Modellorganismus für das aquatische Ökosystem ist der Zebrafisch (*Danio rerio*), der während des gesamten Jahres Eier produziert und eine Generationszeit von ca. 12 Wochen hat.

3.2.2 Life-Cycle-Test mit Nonylphenol

Der nachfolgend beschriebene Life-Cycle-Versuch wurde nach dem in Abb. 3.2.1 dargestellten Schema durchgeführt. Die Aufzucht und Hälterung der Tiere erfolgte gemäß der in Kapitel 2 beschriebenen Weise. Die während der einzelnen Lebensphasen erhobenen Versuchsp Parameter sind in Abb. 3.2.1 aufgezeigt, und die daraus resultierenden Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

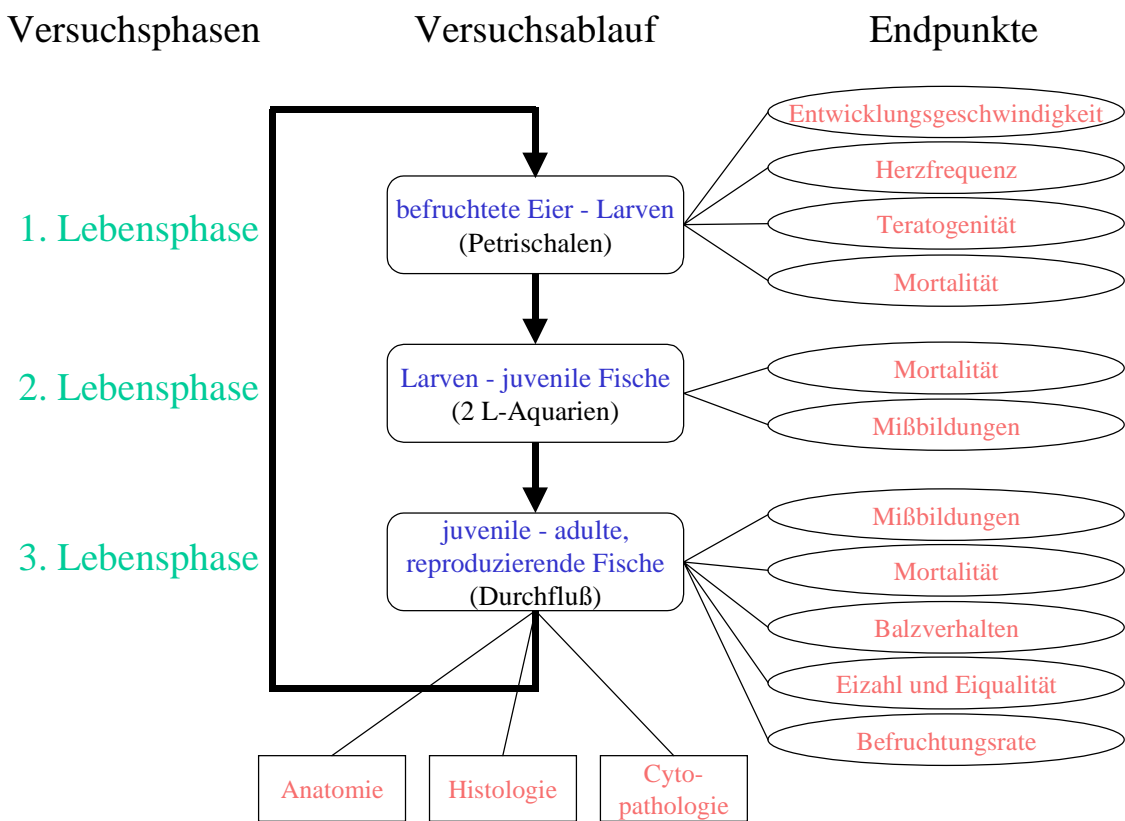


Abbildung 3.2.1 Schema eines Life-Cycle-Versuchs. Dargestellt sind die verschiedenen Versuchsphasen mit den während dieser Zeit erhobenen Parametern. Der Versuch endet mit dem Abläichen und der Befruchtung der Eier für die nächste Generation und der Aufarbeitung der Versuchstiere für die Endpunkte Anatomie, Histologie und Cytopathologie. Auf die rot gekennzeichneten Parameter wird in den folgenden Abschnitten besonders eingegangen.

3.2.2.1 Bestimmung des LC_{50} für Nonylphenol an adulten Zebrabärblingen und Wasseranalysen während des Life-Cycle-Versuchs

Die Testkonzentrationen für den Life-Cycle-Versuch wurden nach der Bestimmung des LC_{50} , nach 96stündiger Exposition auf 2, 20 und 200 $\mu\text{g/L}$, später 100 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol festgelegt. Der LC_{50} nach 96 h lag für adulte Zebrabärblinge bei 400 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol (Abb. 3.2.2).

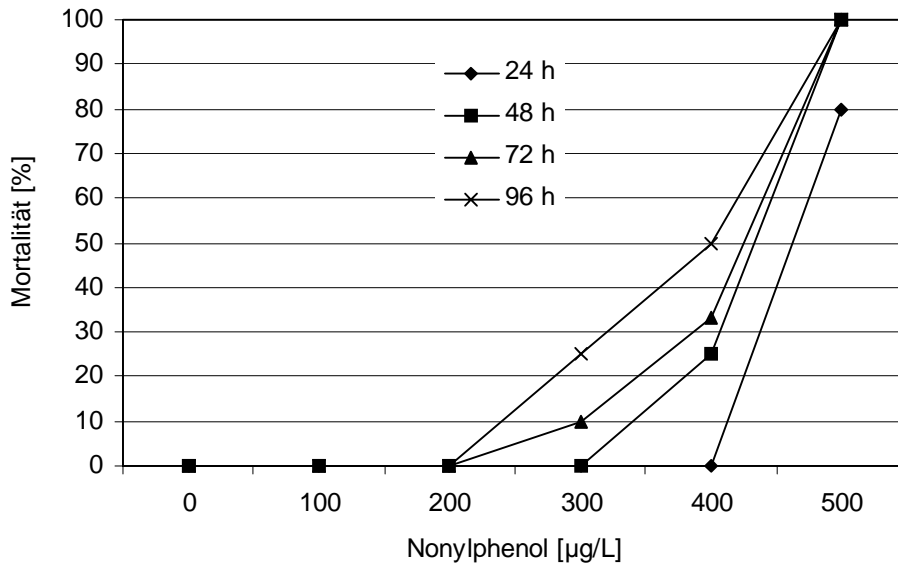


Abbildung 3.2.2: Mortalität adulter Zebrabärblinge (*Danio rerio*) nach Inkubation mit 100 bis 500 $\mu\text{g/L}$ 4-Nonylphenol, zur Bestimmung des LC_{50} nach 96 h. Eingesetzt wurden 12 Tiere pro Konzentration.

Während des Versuches wurde der Nonylphenol-Gehalt in den Aquarien 3 \times durch ein Wasseranalyselabor untersucht. Die Realkonzentrationen entsprachen dabei weitgehend den Sollwerten (s. Tab. 3.2.1)

Tabelle 3.2.1: Realkonzentration im Wasser der Durchflussanlage. Bestimmt wurden die Istwerte im Abstand von ca. 6 Wochen während des Versuchszeitraumes. Die erste Spalte enthält die Werte, die nach dem Vermischen von Stammlösung und Frischwasser über einen Mischzylinder innerhalb der Aquarien erreicht werden sollten. Die übrigen Spalten geben Auskunft über die in den Aquarien tatsächlich erreichten Schadstoffkonzentrationen.

Nominalkonzentration [$\mu\text{g/L}$]	6 Wochen [$\mu\text{g/L}$]	12 Wochen [$\mu\text{g/L}$]	18 Wochen [$\mu\text{g/L}$]
2	$2,2 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,6$	$0,76 \pm 0,9$
20	$20,0 \pm 0,1$	$19,0 \pm 0,7$	$6,8 \pm 9,3$
100	$83,0 \pm 12$	$76,0 \pm 17$	$11,8 \pm 2,4$

3.2.2.2 Embryonal-, Larval- und Juvenilphase (bis 15 d) unter statischer Belastung mit Nonylphenol, 17 β -Estradiol und DMSO.

Wie in Kapitel 2 beschrieben, wurden die Eier bereits vor der Trennung in unbefruchtet und befruchtet mit den Testkonzentrationen 2 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ und 200 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol sowie 0,02 % DMSO, Wasser und 1 μM 17 β -Estradiol behandelt. Das Aussortieren unbefruchteter Eier fand ca. 6 Stunden nach Eiablage statt. Dadurch variiert die in Tabelle 3.2.2 aufgeführte Anzahl eingesetzter befruchteter Eier.

Nach 10tägiger Exposition der Larven gegenüber 200 $\mu\text{g/L}$ war eine Letalität von über 50 % zu verzeichnen. Die verbleibenden Tiere wurden getötet; in einem neuen Ansatz wurden weitere 150 Eier mit 100 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol belastet.

In Tabelle 3.2.2 sind Embryonal-, Larval und Juvenilentwicklung der exponierten Zebrabärblinge dargestellt.

Tabelle 3.2.2: Embryonal-, Larval- und Juvenilentwicklung der Zebrabärblinge unter Exposition gegenüber Nonylphenol

	H ₂ O	DMSO		Nonylphenol			E2	
		0,02 %	2 $\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	1 μM	100 ng/L
Eizahl (n)	120	137	155	145	150	149	143	200
Tag des ersten Schlupfes (d)	3 d	3 d	3 d	3 d	3 d	3 d	3 d	4 d
Missgebildete Larven (n)		-	-	3	7	9	-	-
Mortalität (n) in den ersten beiden Lebenswochen	20	31	29	32	22	> 70	23	10
Anzahl (n) geschlüpfter Larven, 4 Tage nach Eiablage	24	18	40	75	45	-	27	56
Umgesetzte Jungfische (Durchfluss; n)	100	106	116	113	112	-	120	123

Bei der Beobachtung der frühen Lebensstadien der mit Nonylphenol und 17 β -Estradiol belasteten Zebrabärblinge fielen bei 3 - 9 % der mit 20, 100 und 200 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol belasteten Tieren Entwicklungsanomalien wie Ödeme und Wirbelsäulenanomalien auf. Weitere Anomalien, wie die Störung der Somitenbildung, das Fehlen des Herzschlages oder des Blutkreislaufes, Augenanomalien oder sonstige Missbildungen waren nicht erkennbar.

3.2.2.3 Juvenil- und Adultphase (ab 16 d) unter kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol im Durchflusssystem

2 Monate nach Versuchsbeginn mussten die Tiere der 1 µM Estradiol-Kontrolle getötet werden, da sie nicht mehr zur Kotabgabe in der Lage waren. Im einem in Tabelle 3.2.2 aufgeführten neuen Ansatz wurde die 17β-Estradiol-Konzentration auf 100 ng/L reduziert.

Ca. 3 Monate nach Umsetzen der Tiere in die Durchflussanlage war in allen Versuchsansätzen aufgrund der zu hohen Populationsdichte eine Stagnation des Wachstums bei allen Fischen und ein Ausbleiben der geschlechtlichen Differenzierung bei einigen Tieren zu beobachten. Die folgende Reduktion der Individuenzahl auf 62 pro Testansatz erfolgte nach dem Zufallsprinzip, die Anzahl der entnommenen Fische ist in Tabelle 3.2.3 aufgeführt. Die Fische der neuen Estradiol-Kontrolle blieben unberücksichtigt, da sie aufgrund des späteren Ansatzes im Vergleich zu den Tieren der anderen Konzentrationen noch zu klein waren.

Tabelle 3.2.3: Anzahl der 3 Monate nach Versuchsbeginn entnommenen Fische

	0,02 % DMSO	2 µg/L	20 µg/L	100 µg/L
Anzahl der entnommenen Tiere	41	45	49	21

Bei den entnommenen Tieren (zur Anzahl siehe Tab. 3.2.3) wurde das Geschlecht makroskopisch (soweit möglich) und mikroskopisch bestimmt; die hieraus resultierende Verteilung ist in Abbildung 3.2.3 dargestellt.

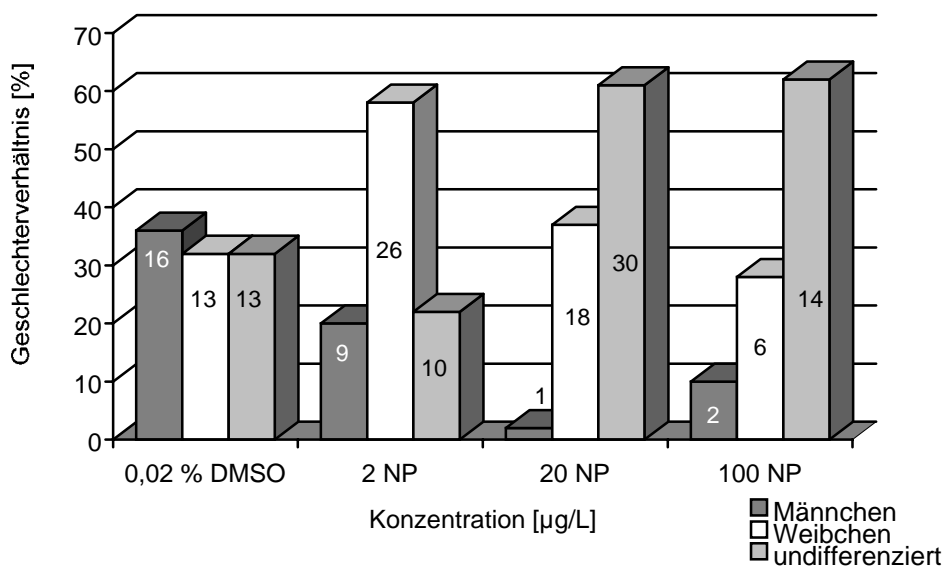


Abbildung 3.2.3: Geschlechterverteilung (in %) nach 3 Monaten Exposition gegenüber unterschiedlichen Nonylphenolkonzentrationen im Durchflusssystem.

Während das Geschlechterverhältnis bei den Tieren der Wasserkontrolle fast ausgeglichen war, zeigte sich bereits bei den mit 2 µg/L Nonylphenol belasteten Tieren eine im Vergleich zu den Männchen (9), um mehr als das doppelte erhöhte Anzahl weiblicher Tiere (26). Bei den Tieren die über ihr gesamtes Leben 20 µg/L Nonylphenol ausgesetzt waren, war dieser Effekt noch verstärkt (Abb. 3.2.3). Neben 18 Weibchen war nur noch 1 Männchen makroskopisch bestimmbar. Nach Exposition gegenüber 100 µg/L Nonylphenol stellte sich der Überhang weiblicher Tiere mit 28 : 10 Männchen nicht so deutlich dar wie zuvor für 20 µg/L Nonylphenol beschrieben, zeigte aber den gleichen Trend. Bei beiden Testansätzen fiel neben dem stark erhöhten Anteil weiblicher Fische eine im Vergleich zu den übrigen Testansätzen sehr hohe Anzahl undifferenzierter Tiere auf.

Verhaltens- und morphologische Auffälligkeiten

Während des gesamten Versuchsverlaufes wirkten die gegenüber 100 µg/L Nonylphenol exponierten Zebrabärblinge auf äußere Einflüsse sehr nervös. Und selbst wenn keine äußere Störung erkennbar war, schwammen sie oft hektischer im Aquarium auf und ab als die Fische der übrigen Testansätze. Beim Herausfangen aus den unterschiedlichen Aquarien wurde dieser Unterschied besonders deutlich, da es fast unmöglich war, die mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten Fische einzufangen.

Nach dem Zusammensetzen der gegenüber 100 µg/L Nonylphenol exponierten Männchen mit gleich belasteten oder unbelasteten Weibchen in den Ablaihbekken, zeigten sich ebenfalls Verhaltensänderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Während die unbelasteten Männchen der Kontrollpaare sofort nach dem Umsetzen in die mit Laichsubstrat ausgestatteten Becken mit der Balz begannen, blieben die belasteten Männchen passiv.

Auch in der äußeren Morphologie unterschieden sich die mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten von den übrigen Fischen. Die Männchen waren aufgrund der vermindert ausgebildeten sekundären Geschlechtsmerkmale nur sehr schwer von den Weibchen zu unterscheiden. Sie wirkten dicker und waren nicht so deutlich gefärbt wie die Kontrolltiere. Auch die Weibchen erschienen im Vergleich zu den Tieren der anderen Testansätze korpulenter. Alle gegenüber 100 µg/L Nonylphenol exponierten Tiere beider Geschlechter zeigten Verkrümmungen der Wirbelsäule im hinteren Körperabschnitt.

Die morphologischen Auffälligkeiten während des Versuches ließen sich durch histologische und anatomische Untersuchung der Tiere nach Beendigung des Versuches untermauern (siehe Abschnitt 3.2.2.10 und 12).

3.2.2.4 *Mortalität der F₁-Generation während der Durchflussphase*

Bei der Bestimmung der Mortalität im Durchflusssystem ergab sich die Schwierigkeit, dass tote Tiere nicht immer aufgefunden werden konnten, da die oft nachts sterbenden Zebrabärblinge teilweise von ihren Artgenossen aufgeessen werden. In Tabelle 3.2.4 ist die Mortalität der F₁-Generation ab der 3. bis zur 28. Lebenswoche dargestellt.

Tabelle 3.2.4: Anzahl der während der Durchflussphase gestorbenen Zebrabärblinge.

	H ₂ O	0,02 % DMSO	2 µg/L NP	20 µg/L NP	100 µg/L NP	E2
Mortalität in der 3. bis 12. Lebenswoche	-	3	9	2	29	-
Mortalität in der 13. bis 28. Lebenswoche	1	1	7	5	10	3

3.2.2.5 *Reproduktionstests zur Ermittlung der Reproduktionsfähigkeit der Nonylphenol-belasteten Zebrabärblinge*

Für die Reproduktionsversuche wurden je 2 × 3 Versuchstiere (1 Weibchen und 2 Männchen = 1 Brutgruppe) aus jedem Versuchsansatz in die Zuchtanlage gesetzt. Da in der Zuchtanlage nur Platz für jeweils 10 Brutgruppen war, musste auf eine der Negativkontrollen verzichtet werden, so dass immer Fische aus allen Nonylphenol-Ansätzen und der 17β-Estradiol-Kontrolle vertreten waren. Die Tiere wurden parallel getestet, um ein möglichst hohes Maß an Vergleichbarkeit der Daten zu erhalten. Die Reproduktionstests fanden insgesamt an fünf Tagen statt, so dass für jeden Ansatz des Life-Cycle-Versuchs insgesamt 10 Brutgruppen getestet werden konnten. Da in den Ansätzen 20 und 100 µg/L Nonylphenol nicht genügend Männchen zur Verfügung standen, wurden diese in mehreren Ansätzen mit unterschiedlichen Weibchen eingesetzt.

Bereits beim Vergleich der Anzahl der erfolgreichen Brutversuche der Brutgruppen ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den Nonylphenol-exponierten Tieren und den Kontrollgruppen (Abb. 3.2.4). So konnte nach Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol nur bei 5 der 10 getesteten Brutpaare Eier nachgewiesen werden, bei den DMSO-Kontrolltieren waren 9 von 10 Paaren erfolgreich bei der Eiablage. Tiere, die über ihr gesamtes Leben mit 100 µg/L Nonylphenol behandelt wurden, konnten keine Eier mehr ablegen. Auch bei den Zebrabärblingen der 17β-Estradiol-Kontrolle fiel die Abnahme der Anzahl erfolgreich ablaichender

Brutpaare auf. Von 10 Brutgruppen war hier nur eine bei der Eiablage erfolgreich, mit im Vergleich zu den Kontrollen deutlich verringerter Eizahl und Befruchtungsrate (4 %; Abb. 3.2.5).

Für die Untersuchung der Eizahlen und Befruchtungsraten der F₁-Generation dienten die mit 0,02 % DMSO behandelten Zebrabärblinge als Kontrollgruppe. Die untersuchten 10 Kontroll-Brutgruppen konnten im Mittel 215 Eier pro Brutversuch ablegen (Abb. 3.2.5) und ca. 60 % der abgelegten Eier befruchten (Abb. 3.2.6 A). Nach Nonylphenol-Exposition ($\geq 2\mu\text{g/L}$) blieb die Eizahl im Vergleich zu den Kontrollgruppen zwar weitgehend konstant, beim Vergleich der Befruchtungsraten fielen allerdings signifikanten Verringerungen gegenüber den Kontrolltieren auf (Abb. 3.2.5; Abb. 3.2.6 A). Bereits ab der Belastung mit $2\mu\text{g/L}$ Nonylphenol konnten nur noch 35 % der abgelegten Eier befruchtet werden. Brutpaare, die über ihr gesamtes Leben mit $20\mu\text{g/L}$ Nonylphenol behandelt worden waren, konnten nur noch weniger als 10 % der produzierten Eier befruchten (Abb. 3.2.5). Das vollständige Ausbleiben des Bruterfolges konnte, wie bereits erwähnt, bei den mit $100\mu\text{g/L}$ Nonylphenol behandelten Fischen beobachtet werden. Diese Fische legten nie Eier und die Männchen konnten selbst mit Kontrollweibchen keine Eier befruchten (s. folgender Abschnitt). Eine starke Beeinträchtigung des Reproduktionserfolges konnte auch bei den mit 17β -Estradiol belasteten Fischen gezeigt werden. Neben der signifikanten Verminderung der Befruchtungsrate auf 4 % war auch eine deutliche Abnahme der Eizahl zu beobachten. Während die Kontrolltiere im Durchschnitt 215 Eier ablegten, waren es bei den mit 17β -Estradiol behandelten Brutpaaren nur ca.

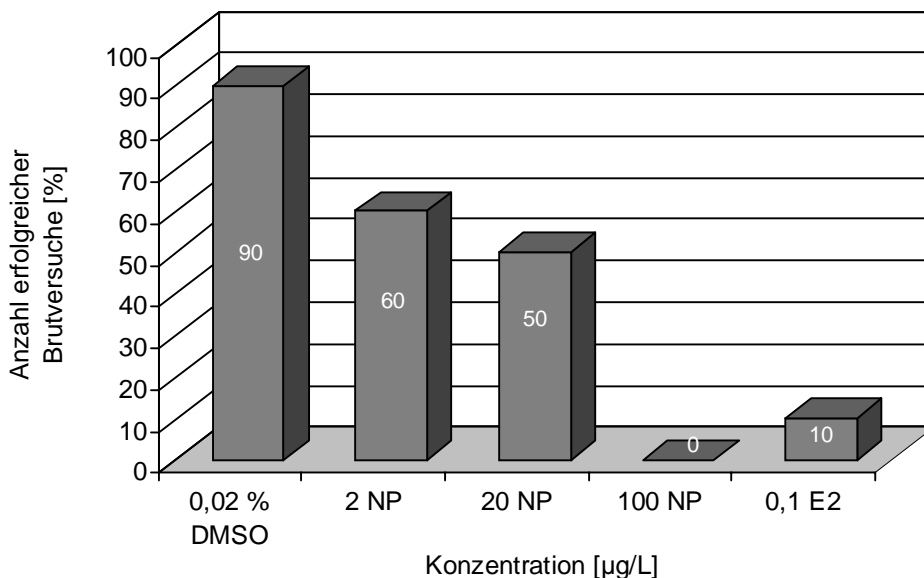


Abbildung 3.2.4: Anzahl der erfolgreichen Brutversuche der Zebrabärblingsbrutpaare, die über ihr gesamtes Leben mit 0,02 % DMSO, 2, 20 und $100\mu\text{g/L}$ Nonylphenol, sowie mit $100\mu\text{g/L}$ 17β -Estradiol behandelt worden waren (n=10).

103 Eier (Abb. 3.2.5).

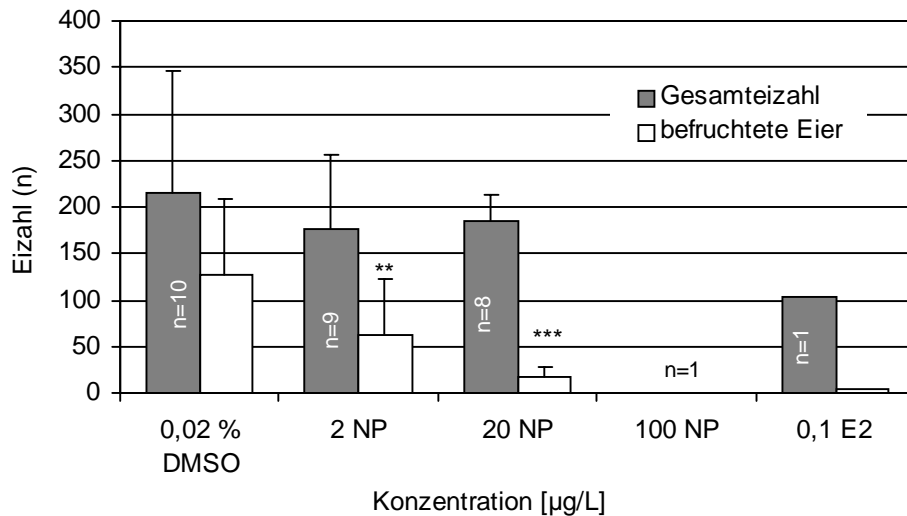


Abbildung 3.2.5: Gesamteizahl und Befruchtungsrate bei Zebrafärblingen (*Danio rerio*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit 4-Nonylphenol, DMSO und 17 β -Estradiol (E2). n = Anzahl erfolgreich laichender Brutpaare. Signifikante Veränderungen gegenüber den DMSO-Kontrollen nach dem Student's t-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Zur geschlechtsabhängigen Untersuchung des Einflusses von Nonylphenol wurden Kombinationstests durchgeführt, bei denen Nonylphenol-belastete Tiere eines Geschlechtes mit unbelasteten Tieren des anderen Geschlechtes verpaart wurden (Abb. 3.2.6). Aus den Ergebnissen dieser Tests wurde deutlich, dass Nonylphenol die Reproduktionsfähigkeit der männlichen Zebrafärblinge stärker beeinträchtigt als die der weiblichen. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt nach Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol: Während die gegenüber 20 µg/L Nonylphenol exponierten Zebrafärblingsweibchen nach Kombination mit Kontrollmännchen (Abb. 3.2.6 C) mit ca. 60 % annähernd gleiche Befruchtungsrate erzielten wie die Kontrolltiere (Männchen und Weibchen unbelastet; Abb. 3.2.6 A), waren die mit 20 µg/L Nonylphenol belasteten Männchen weder in der Lage mit gleich belasteten Weibchen (Abb. 3.2.6 A) noch mit Kontrollweibchen (Abb. 3.2.6 B), eine Befruchtungsrate von mehr als 10 % zu erzielen. Die Befruchtungsrate der mit 20 µg/L Nonylphenol behandelten Männchen blieben somit signifikant unter denen der Kontrolltiere.

Die Kombinationstests mit mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten Tieren zeigten eine deutliche Schädigung beider Geschlechter. Exponierte Männchen waren weder mit gleich belasteten Weibchen noch mit Kontrollweibchen zur Eiproduktion fähig (Abb. 3.2.6 A und B). Nach Verpaarung belasteter Weibchen mit Kontrollmännchen kam es zwar zur Eiablage, doch blieb auch hier die Befruchtungsrate mit 22 % signifikant unter den Kontrollen (Abb. 3.2.6 C).

A

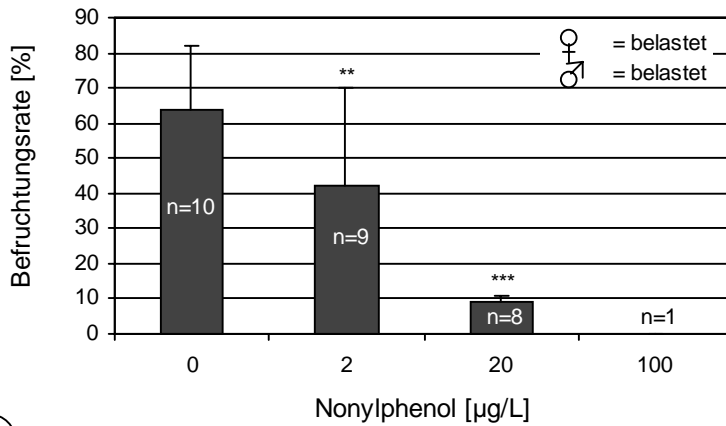
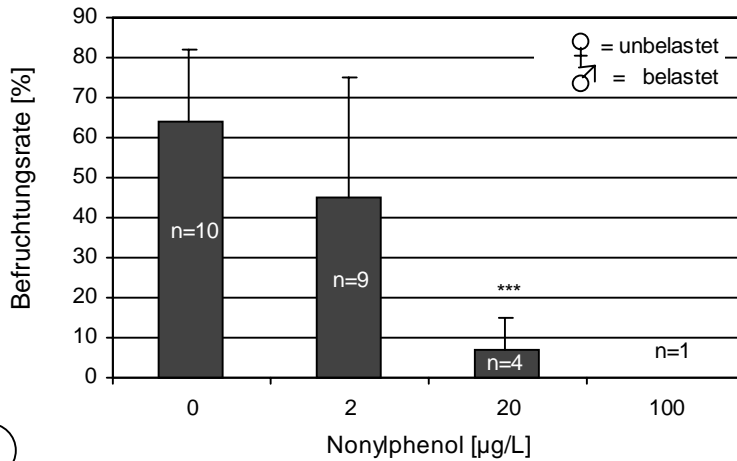


Abbildung 3.2.6: Befruchtungsrate bei Zebraabrärlingen (*Danio rerio*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit 4-Nonylphenol, DMSO und 17 β -Estradiol (E2).

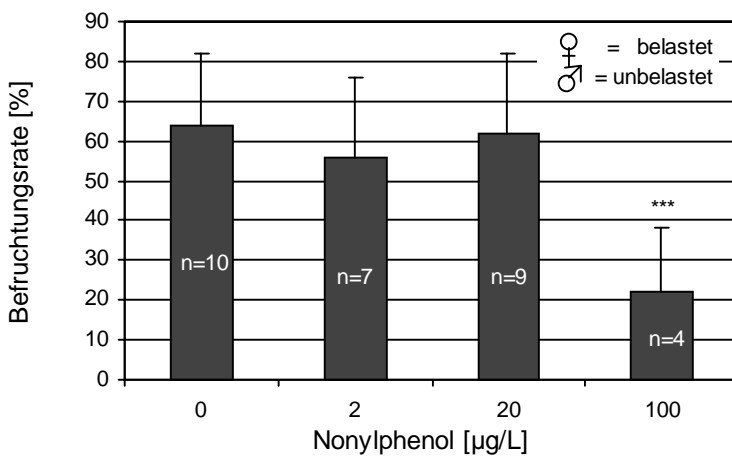
A. Nach dem Verpaaren Nonylphenol-exponierter Männcchen und Weibchen, und den Kontrollen.

B



B. Nach dem Verpaaren Nonylphenol-exponierter Männcchen mit Kontrollweibchen.

C



C. Nach dem Verpaaren Nonylphenol-exponierter Weibchen mit Kontrollmännchen (DMSO-Kontrollen).

Signifikanz der Veränderungen gegenüber den Kontrollen nach Student's t-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. Die Anzahl (n) der Versuche variiert, da nicht alle Brutpaare erfolgreich bei der Eiablage waren.

3.2.2.6 Anomalien in Schlupf und Entwicklung der F₂-Generation

Um Schlupf und Entwicklungsanomalien der F₂-Generation zu untersuchen, wurden jeweils 60 Eier unterschiedlicher Eltern aus jedem Ansatz der F₁-Generation über einen Zeitraum von 8 Tagen beobachtet. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden Entwicklung, Herzfrequenz, Mortalität und Teratogenität dokumentiert und die Schlupfraten am 3., 4. und 5. Tag nach Eiablage verglichen (Abb. 3.2.7). Bereits 36 h nach der Eiablage war bei den Embryonen der mit 2 µg/L Nonylphenol behandelten Tiere eine signifikante Erhöhung der Herzfrequenz im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten (Abb. 3.2.8).

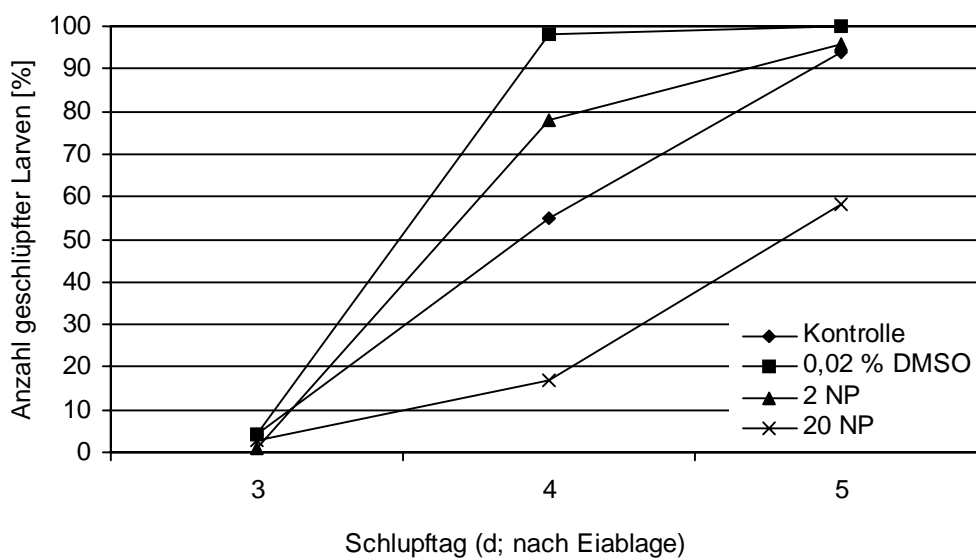


Abbildung 3.2.7: Anzahl der nach 3, 4 und 5 Tagen geschlüpften Larven der F₂-Generation nach Belastung der Elterntiere mit 2 und 20 µg/L Nonylphenol und 0,02 % DMSO. Eier und Larven wurden nach der Eiablage in reinem Wasser in Petrischalen bei 26°C gehalten.

Auch später unterschieden sich diese Tiere deutlich von den Embryonen und Larven der übrigen Versuchsansätze; sie waren beispielsweise 3 Tage nach Eiablage geringer pigmentiert. 4 Tage nach Eiablage, waren bereits über 70 % der Larven geschlüpft, deren Eltern in DMSO bzw. 2 µg/L Nonylphenol gehalten worden waren. Zum gleichen Zeitpunkt waren 17 % der Nachkommen der mit 20 µg/L Nonylphenol belasteten Eltern geschlüpft. 5 Tage nach Eiablage war dieser Effekt noch deutlicher: die Nachkommen der DMSO-, Wasser- und 2 µg/L Nonylphenol-behandelten Tiere waren zu 90 bis 100 % geschlüpft, die der 20 µg/L Nonylphenol belasteten Eltern nur zu 50 %. Die im Ei verbliebenen Embryonen (Bildtafel 5; Bild c) unterschieden sich in ihrer Entwicklung nicht von den freischwimmenden Larven (Bildtafel 5, Bild b). Sie zeigten nun ähnlich weit fortgeschrittene Pigmentierung und auch der Dottersack war weitgehend abgebaut.

In Abbildung 3.2.7 fehlen Daten zu Larven, deren Eltern mit 100 µg/L Nonylphenol und 100 ng/L 17β-Estradiol behandelt wurden. Wie bereits erwähnt, laichten die mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten Tiere nicht ab. Die wenigen befruchteten Eier (Bildtafel 5; Bild a), die nach Verpaaren 17β-Estradiol exponierter Zebrabärblinge gewonnen werden konnten, waren immer bereits einen Tag nach Eiabgabe koaguliert, so dass auch hier keine Untersuchung von Embryonal- und Larvalphase der F₂-Generation möglich war.

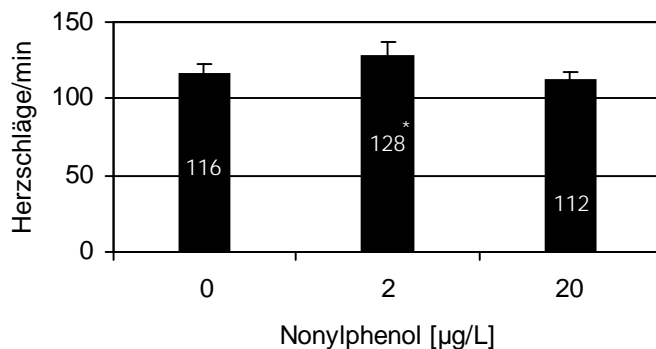


Abbildung 3.2.8: Herzfrequenz ca. 36 h alter Embryonen der F₂-Generation aus dem Nonylphenol-Versuch, deren Eltern unbelastet oder mit 2 und 20 µg/L Nonylphenol belastet waren (n=6). Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach Student's t-Test: *p < 0,05.

Bei fast allen Nachkommen der mit 20 µg/L Nonylphenol belasteten Fische des Life-Cycle-Versuchs konnten nach dem Schlupf leichte Krümmungen im Bereich der Schwanzwirbelsäule festgestellt werden. Leichte Verkrümmungen in diesem Bereich waren auch bei den mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten adulten Tieren zu erkennen und ließen sich durch das Anfärben der Skelettknochen mit Alizarin-Rot (Abschnitt 3.2.2.12) zusammen mit anderen Knochendeformationen nach Versuchsende

deutlich zeigen. Zur genaueren Untersuchung der Wirbelsäulendeformationen bei Larven wurde ein separater Early-Life-Stage-Test durchgeführt, in dem je 20 Tiere den Nonylphenol-Konzentrationen 2, 20, 100 und 200 µg/L ausgesetzt wurden (siehe Kap. 3.2.3).

20 % der Nachkommen der mit 20 µg/L Nonylphenol belasteten Elterntiere hatten sehr starke Wirbelsäulenverkrümmungen (Bildtafel 5; Bild g, h und i). Die bogenförmig verkrümmten Larven waren nicht mehr zu gerichteten Lokomotionen fähig und starben noch während der ersten Lebenswoche. Bei weiteren ca. 30 % der Nachkommen der mit 20 µg/L Nonylphenol belasteten Elterntiere fielen Bauch- und Perikardödeme auf, die meist mit einer Schädigung des Herzens einher gingen (Bildtafel 5; Bild d, e, g und h). Alle untersuchten Tiere hatten zu Beginn der Ödembildung eine stark verminderte Herzfrequenz. In einzelnen Fällen konnten auch Herzrhythmusstörungen beobachtet werden. Diese Tiere starben ebenfalls noch während der ersten Lebenswoche.

Nach Exposition der Zebrabärblinge gegenüber 20 µg/L Nonylphenol traten bei einzelnen Nachkommen Augenschäden auf. Dieser Effekt schien die Fischlarven jedoch nicht merklich zu beeinträchtigen, da sie sonst meist nicht missgebildet waren (Bildtafel 5, Bild f).

Bildtafel 5: Zebrabärblingslarven (*Danio rerio*) der F₂-Generation in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. **a:** Befruchtetes Ei, ca. 4 h nach Eiablage (Vergrößerung: 25 ×). **b:** Gesunde Larve im Alter von ca. 96 h. Die Larven sind zu diesem Zeitpunkt schon deutlich pigmentiert und schwimmen aktiv (Vergrößerung: 26 ×). Von **c – i** sind Larven dargestellt, deren Eltern im Life-Cycle-Versuch mit 20 µg/L Nonylphenol behandelt wurden: **c:** Larve im Alter von 120 h; zu diesem Zeitpunkt sind die Larven unter normalen Umständen bereits geschlüpft. Die hier dargestellte Larve war bis zum Versuchsende nach 7 Tagen nicht in der Lage zu schlüpfen (Vergrößerung: 26 ×). **d:** Perikardial- und Bauchödem, 96 h nach Eiablage (★; Vergrößerung: 26 ×). **e:** Ödem, einher gehend mit stark veränderter Körperform (★; nach 96 h; Vergrößerung: 26 ×) **f:** Zebrabärblingslarve mit normal entwickelter Körperform im Alter von ca. 96 h. Fehlen der Augenanlage und missgebildete Kopfform. Dieses Tier überlebte bis zum Ende des Versuches (7 d; Vergrößerung: 26 ×). **g:** Stark veränderte Körperform und Verringerung der Körperlänge, einher gehend mit starker Ödembildung (★; Vergrößerung: 26 ×). **h:** Stark gekrümmte Fischlarven nach 96 h mit Bauchödem (★; Vergrößerung: 16 ×). **i:** Stark gekrümmte Fischlarven nach 96 h (→; Vergrößerung: 16 ×).

Bildtafel 5

3.2.2.7 *Geschlechterverhältnis der F₁-Generation im Alter von 7 Monaten*

7 Monate nach Versuchsbeginn waren alle Tiere geschlechtsreif. Der bei der ersten Probenahme deutlich gewordene Trend der Geschlechterverschiebung zugunsten des weiblichen Geschlechtes ließ sich bestätigen (Abb. 3.2.9).

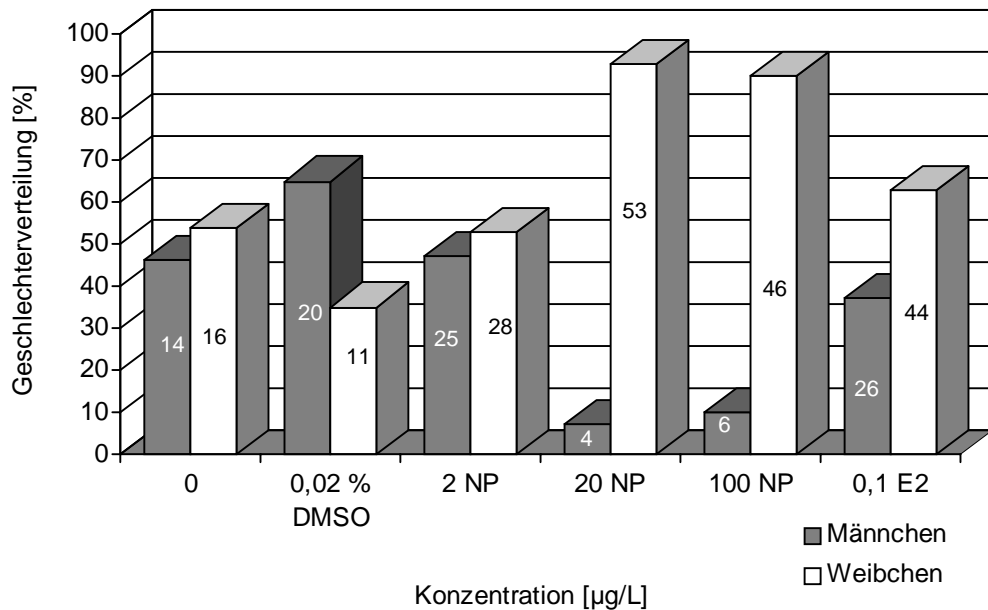


Abbildung 3.2.9: Geschlechterverteilung (in %), nach 7 monatiger Belastung der Zebraabärblinge, mit 2, 20 und 100 µg/L Nonylphenol (NP) sowie 100 ng/L 17β-Estradiol (E2) als Positivkontrolle und 0,02 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Ein Teil der Tiere blieb unbelastet.

Bei den beiden Kontrollgruppen H₂O und DMSO blieb auch bei dieser Probenahme das Verhältnis zwischen Männchen und Weibchen mit 46 : 54 (Wasser) und 65 : 35 (DMSO) nahezu ausgeglichen bzw. zugunsten des männlichen Geschlechtes verschoben. Anders als bei der ersten Probenahme war das Geschlechterverhältnis auch bei den Tieren aus dem 2 µg/L Nonylphenol-Ansatz ausgeglichen: Das Verhältnis entsprach mit 47 : 53 dem der Wasserkontrolle. Ebenso wie bei der ersten Probenahme zeigte sich nach Belastung mit 20 µg/L und 100 µg/L Nonylphenol eine starke Erhöhung der Anzahl weiblicher Individuen. So waren unter den mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten, verbleibenden 52 Tieren nur noch 6 Männchen (Verhältnis: 9 : 1). Bei den Fischen, die über ihren gesamten Lebenszyklus 20 µg/L Nonylphenol ausgesetzt waren, war das Verhältnis sogar noch deutlicher zugunsten des weiblichen Geschlechtes verschoben. Hier kamen auf 53 Weibchen nur noch 4 Männchen (Verhältnis: 93 : 7). Entgegen der Erwartung war das Geschlechterverhältnis der Fische aus

der 17 β -Estradiol-Kontrolle nicht so stark verschoben wie nach Behandlung mit 20 und 100 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol: Hier waren zwar mit 63 % mehr Weibchen vorhanden, doch blieb der Mannchenanteil weit über dem der beiden Nonylphenol-Ansätze (Abb. 3.2.9).

3.2.2.8 Gewichts- und Längenverteilung der F₁-Generation nach 7monatiger kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol

Bei der Untersuchung der Gewichts- und Längenverteilung ergaben sich auch beim Vergleich der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle signifikante Unterschiede (Tab. 3.2.5). Der Einfluss von DMSO führte bei männlichen und weiblichen Zebrabärblingen zu einer Erhöhung des Gewichts bei gleichbleibender Länge (siehe auch Abb. 3.2.10). Dennoch waren weitere Gewichtsveränderungen an den schadstoffexponierten Zebrabärblingen beider Geschlechter im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen zu beobachten. So nahm das Gewicht der Männchen nach Belastung mit 100 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen signifikant zu, signifikante Längenveränderungen blieben aber aus (Tab. 3.2.5). Bei der Betrachtung des Konditionsfaktors (Abb. 3.2.10) ließ sich diese Signifikanz allerdings nicht bestätigen. Signifikante Veränderungen des Konditionsfaktors zeigten sich an den mit 2 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol und 100 ng/L 17 β -Estradiol behandelten Männchen im Vergleich zu den Wasserkontrollen.

Bei den Weibchen war kein eindeutiger Trend bei den Gewichtsveränderungen zu beobachten. Hier könnten die in Abbildung 3.2.10 dargestellten Effekte auf das im Schadstoffansatz enthaltene DMSO zurückgehen, da das Gewicht der Lösungsmittel- und 100 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol-behandelten Tiere kaum voneinander abwich. Eine eindeutige Veränderung ließ sich hier nur in der signifikanten Reduktion des Gewichts 17 β -Estradiol-belasteter Weibchen feststellen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.2.5: Mittelwerte und Standardabweichung von Gewicht und Länge der Zebrabärbling der F₁-Generation (Alter 5 Monate) nach Exposition während des gesamten Lebenszyklus mit Nonylphenol, DMSO und 17β-Estradiol.

	Gewicht [g]		Länge [cm]	
	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
Kontrolle	0,46 ± 0,13	0,32 ± 0,08	3,84 ± 0,42	3,59 ± 0,37
0,02 % DMSO	0,62 ± 0,15 ^{***1}	0,43 ± 0,05 ^{***1}	3,85 ± 0,30	3,71 ± 0,17
2 µg/L Nonylphenol	0,53 ± 0,11	0,38 ± 0,05 [*]	3,85 ± 0,32	3,70 ± 0,15
20 µg/L Nonylphenol	0,45 ± 0,11 ^{***}	0,36 ± 0,05 [*]	3,66 ± 0,29	3,50 ± 0,10
100 µg/L Nonylphenol	0,64 ± 0,15	0,60 ± 0,12 ^{***}	3,93 ± 0,31	4,24 ± 0,18
0,1 µg/L 17β-Estradiol	0,33 ± 0,07 ^{***2}	0,29 ± 0,06 ^{***}	3,40 ± 0,27	3,36 ± 0,19

Signifikanz der Unterschiede zu den DMSO-Kontrollen nach Student's t-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

¹: Signifikanz beim Vergleich der Lösungsmittel-Kontrollen mit den Wasserkontrollen.

²: Die 17β-Estradiol-Kontrollen wurden mit den Wasserkontrollen abgeglichen, da Estradiol nicht in DMSO vorgelöst worden war.

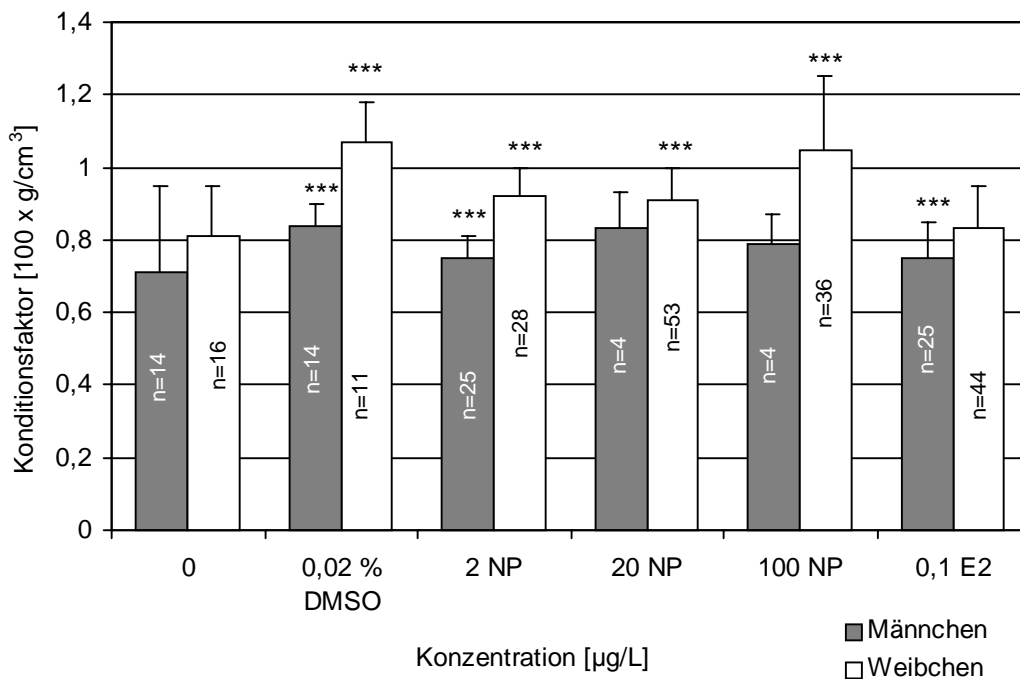


Abbildung 3.2.10: Konditionsfaktoren der F₁-Generation der Zebrabärblinge, nach 7-monatiger Exposition gegenüber unterschiedlichen Nonylphenolkonzentrationen, DMSO und 17β-Estradiol im Durchflusssystem. Die Signifikanz der Veränderungen gegenüber den Kontrollen wurde mit dem Student's t-Test ermittelt: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

3.2.2.9 *EXKURS: Anatomie und Histologie von Ovar und Hoden des Zebrabärblings (Danio rerio)*

Im nachfolgenden Abschnitt sind zum besseren Verständnis des Aufbaus von Hoden und Ovar sowie der unterschiedlichen Oocyten-Reifestadien und Oocyten-Atresiestadien Beschreibungen aus der Literatur mit eigenen Abbildungen unterlegt.

Hoden

Die Testes des Zebrabärblings sind paarige, langgestreckte Strukturen, die beidseitig dorsal in der abdominalen Körperhöhle verlaufen und über Mesenterien an der Körperwand aufgehängt sind. Auf jedem Hoden verlaufen ca. 5 Ductus efferentes, die die reifen Spermien aus den Tubuli seminiferi aufnehmen und sie zur Genitalpapille führen. Die Tubuli seminiferi bilden ein Netzwerk, in dessen Wänden sich die synchron entwickelnden Spermatogonien und Spermatocyten innerhalb von Spermatocysten befinden (Ewing, 1972; Laale, 1977). Die Spermatogenese läuft innerhalb der Spermatocysten, deren Wände von Sertoli-Zellen gebildet werden, synchron ab (Grier et al., 1980; Pudney, 1995; Patiño, 1997). Die fertig entwickelten Spermien gelangen nach der Auflösung der Cystenwand in das Tubuluslumen (Grier et al., 1980; Grier, 1981).

Ovarien

Die Ovarien sind wie die Hoden paarige, langgestreckte Strukturen, die beidseitig dorsal in der Körperhöhle verlaufen und immer getrennt voneinander angelegt sind. Bei den Zebrabärblingen, die über das gesamte Jahr laichbereit sind, befinden sich innerhalb der Ovarien immer Oocyten unterschiedlicher Reifestadien, die anhand charakteristischer Merkmale voneinander unterschieden werden können (die folgende Beschreibung nach Selman et al., 1993, und Takashima, 1986, gilt für Färbungen mit dem Goldner-Gemisch):

- Reifestufe I – Primäre Wachstumsphase:
 - ⇒ Stadium A: Präfollikuläre Phase des primären Wachstums: Die Oocyten liegen innerhalb eines Oocytennestes und alle Oocyten sind in der gleichen Phase der meiotischen Prophase. Die Chromosomen sind deutlich sichtbar.
 - ⇒ Stadium B: Follikelphase des primären Wachstums: Die Oocyten sind aus dem Nest ausgewandert und besitzen jetzt einen Follikel (Abb. 3.2.11). Die Kerne der Oocyten sind groß und enthalten viele randständige Nucleoli. Das Cytoplasma färbt sehr dunkel. Die Theca ist extrem dünn und erscheint meist nur als grüner Saum. Zwischen den Follikeln liegen Lymphräume und Blutgefäße. Das Cytoplasma ist weitgehend vakuolenfrei (Bildtafel 6, Bild c-I).

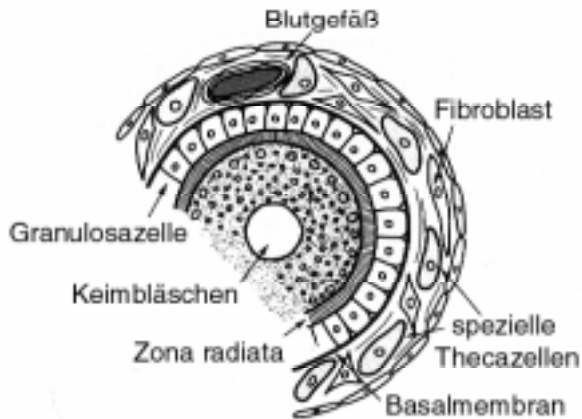


Abbildung 3.2.11: Schematisierte Darstellung einer frühen, vitellogenen Fischeocyte mit den umgebenden Follikelschichten. Granulosa- und Thekaschicht sind durch eine Basalmembran voneinander getrennt. Die Theka setzt sich aus Fibroblasten, Blutgefäßen und speziellen großen Thekazellen zusammen (verändert nach Nagahama, 1983).

- Reifestufe II: Cortical-Alveolus Stadium: Die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des nur noch schwach färbenden Cytoplasmas verschoben. Im letzteren bilden sich zahlreiche corticale Alveoli, membranbegrenzte Vesikel unterschiedlicher Größe, die Proteine und Kohlenhydrate enthalten (Bildtafel 6, Bild d). Diese Corticalvesikel spielen bei der späteren Befruchtung des Eies, bei der sogenannten Corticalreaktion, eine Rolle (Wehner und Gehring, 1990). Vereinzelt treten in diesen Vesikeln auch rot angefärbte Granula auf. Die Zellen und Kerne der Granulosa sind größer, die Theca verdickt. Fibroblastenkerne und Faserbündel sind gut erkennbar. In diesem Stadium hat die Vitellogenese noch nicht begonnen.

- Reifestufe III: Vitellogenese: Das Cytoplasma erscheint jetzt lichtgrün-positiv mit sehr vielen Dottervakuolen, die zum Kern hin größer werden. Die Corticalvesikel sind vermehrt peripher angeordnet (Bildtafel 6, Bild e). Der Kern erscheint oft geschrumpft (Artefakt) und die Anzahl der Nucleoli ist deutlich verringert. Am Ende dieser Phase bewegt sich der Kern von seiner zentralen Lage im Ooplasma weg.
- Reifestufe IV: Oocytenreifung. Der Oocytenkern wandert zur Peripherie der Oocyte und ist nur noch sehr schwer zu erkennen. An histologischen Schnitten ist es schwer, Follikel, die sich in der Vitellogenese befinden, von reifenden Stadien zu unterscheiden, da es keine strukturellen Marker gibt, die den Übergang kennzeichnen. Da die Oocytenreifung ein sehr schneller Prozess ist und bei Zebrafärblingen, die in den frühen Morgenstunden laichen, während der Nacht stattfindet (Selman et al., 1993), werden in den im Folgenden dargestellten Schnitten, außer bei den gegenüber 17β -Estradiol exponierten Weibchen, keine Oocyten der Reifestufe IV zu finden sein.

Neben den beschriebenen Oocytenreifestufen finden sich in den Ovarien oft eine Reihe weiterer Strukturen wie postovulatorische und atretische Follikel. Atretische Follikel entstehen aus sekundären oder reifen anovulatorischen Follikeln (Selman et al., 1993). In neueren Publikationen wird für den Menschen auch die Atresie von Primärfollikeln beschrieben.

Einige Autoren (Chan et al., 1967; Van Ree, 1975) untergliedern atretische Follikel der Fische in verschiedene Stadien, die durch in Tabelle 3.2.6 aufgeführte Merkmale gekennzeichnet sind. Abbildung 3.2.12 zeigt schematische das Aussehen der verschiedenen Atresiestadien.

Tabelle 3.2.6: Atresiestadien und die für jedes Stadium charakteristischen Merkmale nach Chan et al. (1967) und Van Ree (1975).

Atresiestadien	Merkmale	Bildtafelnr.
Corpus atreticum Typ 1	(a) Vorhandensein normaler Thekazellen. (b) Leicht hypertrophe Granulosazellen, leichte Degenerationserscheinungen der Oocyte, wie Vakuolisierung, Akkumulation gelber Pigmente, etc. (c) Granulosazellen deutlich hypertroph und von veränderter Form. (d) Gefaltete und kollabierte Follikelwand (bestehend aus Theka- und Granulosaschichten) und nahezu vollständiges Verschwinden der Oocytenreste. (e) Deutliche Veränderungen der Granulosazellen, wie reduziertes Cytoplasma, Erscheinung von Lipidtropfen, etc.	12 Bild 12a, b
Corpus atreticum Typ 2	(f) Deutliche Hyperplasie der Thekazellen, die 3 – 7 × verdickt sind. Granulosazellen von normaler Erscheinung, Oocyten im letzten Stadium der Oolyse. Thekazellen z. T. mit pyknotischen Kernen. (g) Thekazellen besetzen das Follikellumen und dringen in die degenerierende Oocyte ein. (h) Verkleinerter Follikel durch Reduktion der Vaskularisierung.	12 Bild 12c, d, e, f
Corpus atreticum Typ 3	In Fischen, in denen diese Atresieform vorkommt, erscheinen die Gonaden kollabiert und eine gelbliche Flüssigkeit überschwemmt die Gonadenhöhle. Die Follikel dieses Typs erscheinen leer, obwohl Oocytenreste vorhanden sind. Das Follikel­epithel ist zu einer oder zwei Lagen flacher Zellen reduziert. Um die Peripherie vieler atretischer Follikel sind Aggregate weniger Zellen erkennbar, die ähnlich denen des Typ 1 d sind. Dieser Typ findet sich hauptsächlich in Mischgonaden.	11 Bild 11b
Corpus atreticum Typ 4	Kollaps der Follikelwand. Nach der Färbung erscheint nur das gestreifte Chorion entweder kollabiert, gefaltet oder zerrissen; andere Oocyten­elemente fehlen. Anhand des Chorions erkennt man, dass dieses Atresiestadium aus reifen Oocyten entsteht.	12 Bild 12i, j
Corpus atreticum Typ 5	Hierbei handelt es sich um kleine, runde oder ovale Zellaggregate, die von einer dünnen Follikelzellkapsel umhüllt werden.	nicht gezeigt

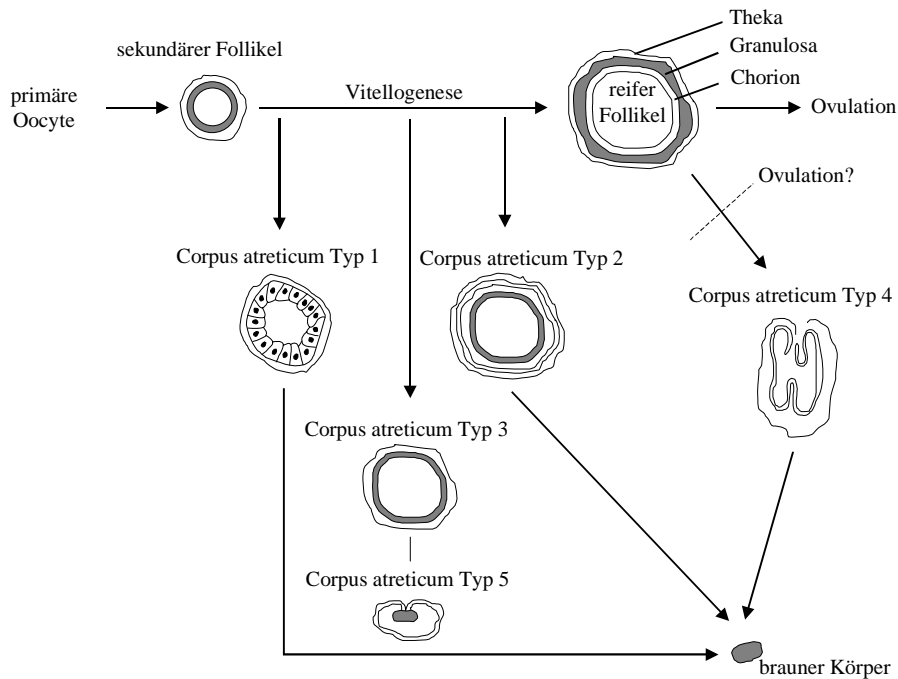


Abbildung 3.2.12: Schema, das hypothetisch die Entstehung der unterschiedlichen Typen atretischer Eier zeigt (Chan et al., 1967).

Nach der Ovulation bleiben die geschrumpften Follikelwände, bezeichnet als postovulatorische Follikel, in den Ovarien zurück. Sie bestehen sowohl aus Thekazellen als auch aus einer Lage dicht gepackter Granulosazellen, die zum Teil in das Lumen hineinragen. Kurz nach der Ovulation können die Granulosazellen Lipid- oder Dottertropfen enthalten. Kleine Dotterkügelchen und Lipidtröpfchen sind auch im Lumen der postovulatorischen Follikel zu finden.

3.2.2.10 Histologische Befunde der Gonaden der Zebrabärblinge der F₁-Generation

Für die Untersuchung der morphologischen Veränderungen wurden jeweils 10 der zu Versuchsende entnommenen Zebrabärblinge von der Kiemenregion bis zum Körperende quer geschnitten. Auf den Querschnitten waren neben Ovar- bzw. Hodengewebe zumeist Anschnitte von Muskulatur, Wirbelsäule, Niere, Schwimmblase, Pankreas, Darm, Haut, Skelettelementen und Leber erkennbar. Für den Vergleich der Tiere aus den unterschiedlichen Schadstoffansätzen mit den Kontrollen wurden Schnitte aus dem Brustflossenbereich herangezogen, weil hier die Gonaden bereits voll ausgebildet zu erkennen waren und der Körperabschnitt durch die mit angeschnittenen Flossen gut festgelegt werden konnte.

Weibchen der DMSO- und Wasserkontrolle

Die Ovariengröße der Kontrolltiere war im Gegensatz zur Hodengröße sehr variabel, bei den meisten Tieren jedoch wieder ähnlich der Lebergröße im Bereich der Brustflossen. In den Ovarien aller Kontrolltiere konnten unterschiedliche Entwicklungsstadien der Oocyten gefunden werden (Bildtafel 6). In jedem Ovar waren zahlreiche Eier der Reifestufe III (Bild 6a, b und e), das heißt fast ausgereifte Eier, vorhanden. Oocyten der Reifestufe I und II, zeigten sich meist in Gruppen angesiedelt, hauptsächlich in der lateralen Peripherie des Ovars (Bild 6a, b, c und d). Bei einem Teil der Tiere waren postovulatorische Follikel (Bild 6f) zu beobachten. Atretische Eier kamen bei keinem Kontrollweibchen vor.

Männchen der DMSO- und Wasserkontrolle der F₁-Generation

Die Hoden der männlichen Kontrolltiere hatten in der untersuchten Schnittebene (Brustflossenbereich) annähernd die Größe der ebenfalls angeschnittenen Lebern. Sie lagen langgestreckt von ventral nach dorsal entlang der Schwimmblase und schmiegten sich ventral direkt an die Leber an. Innerhalb der Hoden waren die einzelnen Tubuli seminiferi, deutlich voneinander abgegrenzt zu erkennen. Die Tubuli waren im Querschnitt länglich und erschienen locker organisiert. Immer waren unterschiedliche Reifestadien der die Spermatogenese durchlaufenden Samenzellen zu erkennen. Die einzelnen Zellpopulationen lagen deutlich voneinander getrennt in den Tubuluswänden (Bildtafel 7).

Bildtafel 6: Ovar weiblicher Kontrollzebrabärblinge

Bildtafel 6: *Beschreibung siehe Seite 61.*

Folgende Entwicklungsstadien konnten dokumentiert werden:

- Primäre Spermatogonien (Bild 7b, c - 1) waren nur sehr selten und in geringer Zahl zu finden.
- Die in der Spermatogenese aus den primären Spermatogonien (Bild 7a, b, c – 2) hervorgehenden sekundären Spermatogonien waren in kleinen Gruppen von 3 – 10 Zellen in jedem Schnitt erkennbar.
- In ihrer unmittelbarer Nachbarschaft waren die aus den Spermatogonien durch meiotische Teilung entstehenden primären Spermatocyten meist in großer Anzahl lokalisiert (Bild 7a, b, c – 3). Diese Zelltypen waren deutlich anhand der in ihnen paarig angeordneten Chromosomen zu erkennen. Aus primären Spermatocyten entstehen nach der ersten und zweiten Reifeteilung sekundäre Spermatocyten (Bild 7a, b, c – 4) und Spermatisden (Bild 7a, b, c – 5).

Das Lumen der Tubuli enthielt immer große Mengen an Spermien (Bild 7a, b, c – 6), war aber trotzdem nie vollständig gefüllt. Die Spermienansammlungen wirkten locker, so dass zwischen Tubulolumen und Tubuluswand immer ein Zwischenraum erkennbar war. An wenigen Schnitten waren Sertoli-Zellen zu sehen (Bild 7c – 7).

Weibchen nach Belastung mit 2 µg/L Nonylphenol

Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren bei den Weibchen, die über den gesamten Lebenszyklus mit 2 µg/L Nonylphenol belastet wurden, geringe morphologische Veränderungen zu beobachten. Während die Ovariengröße und die Häufigkeit der unterschiedlichen Oocytenreifestufen identisch zu den Kontrollen waren, konnten nach Belastung mit der geringsten Nonylphenol-Dosis vereinzelt atretische Follikel beobachtet werden (Bildtafel 8; Bild a; Tab. 3.2.7).

Siehe gegenüberliegende Seite:

Bildtafel 6: Histologie des Ovars und einzelner Eizellen unbelasteter bzw. mit 0,02 % DMSO behandelte Zebraabblingsweibchen der F₁-Generation. **a:** und **b:** Anschnitt von Leber und Ovar im Bereich der Brustflossen. Zu erkennen: Oocyten der Reifestufen I, II, und III, sowie in Bild b postovulatorische Follikel (★; Vergrößerungen: **a:** 64 ×; **b:** 100 ×). **c:** Oocyten der Reifestufen I und II. Reifestufe I: deutlich erkennbarer Nucleus mit zahlreichen braun färbenden Nucleoli. Cytoplasma sehr dunkel färbend. Die Theca ist nur als dünner grüner Saum zu erkennen. Reifestufe II: Zunahme der Vakuolenbildung im Cytoplasma (★), im Nucleus sind immer noch deutlich die jetzt randständigen Nucleoli erkennbar (Vergrößerung: 240 ×). **d:** Späteres Stadium der Reifestufe II: stark erhöhte Vesikelbildung (★) im jetzt schwächer färbenden Cytoplasma und Nucleus mit randständigen Nucleoli (▶; Vergrößerung: 280 ×). **e:** Oocyten der Reifestufe III. In diesem Stadium hat, erkennbar am Auftreten der Dottervakuolen, die Vitellogenese bereits begonnen. Peripher sind Cortikalvesikel angeordnet. Der Nucleus ist artifiziell geschrumpft, die Nucleoli sind nicht mehr erkennbar. Die Eihülle ist deutlich verdickt (▶; Vergrößerung: 128 ×). **f:** Postovulatorische Follikel (Vergrößerung: 204 ×).

Bildtafel 8: *Beschreibung siehe Seite 65.*

Bildtafel 9: *Beschreibung siehe Seite 65.*

Männchen nach Belastung mit 2 µg/L Nonylphenol

Bei männlichen Zebrabärblingen, die über ihr gesamtes Leben mit 2 µg/L Nonylphenol belastet wurden, waren histologische Veränderungen dokumentierbar. Während Hoden- und Tubulusstruktur im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert blieben, fielen die prall mit Spermien angefüllten Tubuluslumina auf (Bildtafel 9, Bild a). Die Verdichtung der Spermien war bei allen untersuchten Tieren zu beobachten.

Siehe gegenüberliegende Seite:

Bildtafel 7: Histologie des Hodens und der die Spermatogenese durchlaufenden Zellstadien unbelasteter bzw. mit 0,02 % DMSO exponierter Zebrabärblingsmännchen des Life-Cycle-Versuchs. Die unterschiedlichen Reifestadien sind wie folgt gekennzeichnet: 1 = primäre Spermatogonie; 2 = sekundäre Spermatogonie; 3 = primäre Spermatocyte (z. T. während der ersten meiotischen Teilung); 4 = sekundäre Spermatocyte (z. T. während der zweiten meiotischen Teilung); 5 = Spermatide; 6 = Spermium; 7 = Sertoli-Zelle. **a:** Anschnitt von Leber und Hoden im Bereich der Brustflossen. Erkennbar sind die locker organisierten, ovalen Tubuli seminiferi. Die Tubuluslumina sind mit Spermien angefüllt. Bis auf primäre Spermatogonien sind alle die Spermatogenese durchlaufenden Reifestadien erkennbar. Die Hepatocyten wirken leer, nur der dunkel angefärbte Kern ist zu erkennen (Vergrößerung: 360 ×). **b:** Neben den Hodenzelltypen, die bereits unter a erkennbar waren, sind hier auch primäre Spermatogonien zu finden (Vergrößerung: 437 ×). **c:** Bis auf Spermatiden sind alle Spermatogenestadien zu finden. Auch Sertoli-Zellen (7), die eine unterstützende Funktion während der Spermienreifung einnehmen, sind zu sehen (Vergrößerung: 730 ×).

Bildtafel siehe folgende Seiten:

Bildtafel 8: Querschnitt zweier Zebrabärblingsweibchen im Bereich der Brustflossen. **a:** Nach Belastung mit 2 µg/L Nonylphenol. Das Ovar erscheint im Vergleich zu den anderen angeschnitten Organen nicht vergrößert und seine Organisation entspricht der der Kontrolltiere. Im Ovar sind aller Reifestadien der Oocyten erkennbar. **b:** Nach Belastung mit 100 µg/L Nonylphenol. Zu erkennen ist eine deutliche Vergrößerung des Ovars, das zum Teil mit einer grünen Gallerte angefüllt ist. Sowohl innerhalb als auch außerhalb der Gallerte sind unterschiedliche atretische Follikel erkennbar (►; Vergrößerung: **a:** und **b:** 42 ×).

Bildtafel 8: Ovar 2 und 100 NP

Bildtafel 9: Hoden 2 NP

Bildtafel 9 a: Querschnitt durch den Hoden eines während des gesamten Lebens mit 2 µg/L Nonylphenol belasteten männlichen Zebrafärbings. Äußere Hodenstruktur und innere Hodenaufteilung, mit langgestreckten Hodentubuli, entsprechen weitgehend den Kontrolltieren. Auffällig sind die prall mit Spermien angefüllten Hodentubuli (→; Vergrößerung: 140 ×).

Weibchen nach Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol

Während die Gesamterscheinung der Gonaden der mit 20 µg/L Nonylphenol belasteten Zebrabärblingsweibchen nicht merklich von den Kontrolltieren abwich, zeigten sich in der Zusammensetzung der vorhandenen Oocytenreifestadien deutliche Unterschiede. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die Anzahl der Oocyten der Reifestufen I und II im Verhältnis zu der Reifestufe III deutlich erhöht (Bildtafel 10, Bild b). Bei 20 % der Tiere kamen Ovarien vor, die ausschließlich Eier der frühen Reifestufen enthielten (Bildtafel 10, Bild a; Tab. 3.2.7). Atretische Follikel waren selten zu beobachten.

Männchen nach Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol

Bei den männlichen Zebrabärblingen, die über ihr gesamtes Leben mit 20 µg/L Nonylphenol belastet wurden, zeigten sich die gleichen Effekte wie zuvor bei den mit 2 µg/L Nonylphenol belasteten Tieren. Veränderungen der Hodenstruktur waren auch hier nicht zu erkennen, aber die Tubuli seminiferi waren immer prall mit Spermien angefüllt.

Weibchen nach Belastung mit 100 µg/L Nonylphenol

Die Weibchen erschienen nach Belastung mit 100 µg/L Nonylphenol schon vor der Eröffnung der Leibeshöhle sehr dick, und bei fast allen Tieren waren die Eier bereits nach der Betäubung durch die Bauchdecke hindurch sichtbar und traten beim Eröffnen der Leibeshöhle hervor. Viele dieser Eier waren eckig. An den histologischen Schnitten war eine deutliche Vergrößerung der Ovarien mit einer erhöhten Eizahl bei allen exponierten Weibchen im Vergleich zu den Kontroll- und zu den mit 2 µg/L Nonylphenol behandelten Weibchen zu erkennen (Bildtafel 8, Bild b). Auch war der Anteil der oft sehr großen Oocyten der III. Reifestufe bei 80 % der Tiere deutlich erhöht (Bildtafel 11, Bild a; Tab. 3.2.7). Die eckigen Eier fielen auch hier wieder auf. Bei allen untersuchten Tieren war eine große Menge atretischer Follikel zu erkennen.

Bildtafel 10: Querschnitt durch das Ovar zweier Zebrabärblingsweibchen nach Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol. **a:** Das Ovar enthält ausschließlich Oocyten der Reifestufe I. **b:** Das Ovar enthält alle Oocyten-Reifestufen. Auffällig ist die erhöhte Anzahl an Eizellen der Reifestufen I und II. In der rechten oberen Ecke ist ein atretischer Follikel (AF) zu sehen (Vergrößerungen: 36×).

Bildtafel 10: Ovar Zebrabärblinge 20 NP

20 % der mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten Zebrabärblingsweibchen trugen große degenerierte Oocyten in den Ovarien (Bildtafel 11, Bild b), die im Gegensatz zu den übrigen reifen Eizellen in ihrem Inneren einheitlich grün angefärbt waren und keine Strukturen von Keimbläschen oder Dotter- und Fetttropfchen erkennen ließen (Bildtafel 12, Bild j). Eine Anhäufung dieser Oocyten war im dorsalen Bereich der Ovarien zu beobachten (Bildtafel 8 und 11, Bild b). Bei 10 % der Tiere fielen in diesem Bereich auch zusammengefaltete Chorionaggregate auf (Bildtafel 11, Bild b), die als charakteristische Merkmale für Corpora atretica des Typ 4 gelten (vergl. Tab. 3.2.7). Umgeben waren diese Strukturen von einer grün färbendem Gallerte. Bei einem Teil der Tiere waren die dorsalen Spitzen der Ovarien komplett mit dieser Substanz gefüllt, vereinzelt waren dann noch schemenhaft Eihüllen erkennbar (Bildtafel 11, Bild b).

Aber auch atretische Follikel unterschiedlicher Typen waren in den Ovarien der gegenüber 100 µg/L Nonylphenol exponierten Zebrabärblingsweibchen zu finden (Bildtafel 12, Bild a – k). Diese degenerierenden Follikel sind in Bildtafel 12 dargestellt. Da ihre Charakterisierung in Tabelle 3.2.7 beschrieben ist, sind an dieser Stelle auch die Verweise zu den in der Bildtafel zusammengestellten Bildern und deren Bedeutung zu finden.

Männchen nach Belastung mit 100 µg/L Nonylphenol

Die Gesamterscheinung der Hoden wich im Querschnitt sehr stark von den Kontrollmännchen ab. Während bei den Kontrolltieren die Hoden eher langgestreckt und aufgelockert erschienen, wirkten sie hier abgerundet und stark komprimiert. Auch die innere Struktur der Hoden unterschied sich deutlich von den Kontrollhoden. Während die Anzahl der nunmehr fast runden Tubuli innerhalb der Hoden deutlich erhöht schien, blieb der Durchmesser jedes einzelnen Tubulus weit unter dem der Kontrollhoden zurück (Bildtafel 13).

Aufgrund der Spermienmenge und des Tubulusaufbaus ließen sich zwei Gruppen unterscheiden:

- Bei 20 % der Männchen waren im Lumen der Tubuli fast keine Spermien zu erkennen. Dafür waren bei diesen Tieren die Tubuluswände mit den darin enthaltenen, die Spermiogenese durchlaufenden Zelltypen sehr stark ausgeprägt (Bild 13a, b).
- Bei der zweiten Gruppe der Männchen (80 %) war das Lumen der Tubuli seminiferi prall mit Spermien angefüllt, so dass kein Freiraum zu den Wänden zu erkennen war. Die Gesamtzahl der Spermien schien im gesamten Hoden deutlich erhöht (Bild 13c, d).

Bildtafeln siehe folgende Seiten:

Bildtafel 11: Querschnitt durch das Ovar zweier mit 100 µg/L Nonylphenol behandelter Zebrabärblingsweibchen. **a:** Das nur einseitig entwickelte Ovar ist hauptsächlich aus Oocyten der Reifestufe III zusammengesetzt. Viele dieser Oocyten zeigen bereits Anzeichen beginnender Atresie. Oocyten der Reifestufen I und II sind relativ selten zu sehen. **b:** Dargestellt ist das Ovar im Bereich der Bauchflossen. Auffällig ist die hohe Anzahl atretischer Follikel (→). Das gesamte Ovar scheint mit einer grün färbenden Gallerte angefüllt zu sein. Oocyten der Reifestufe III sind nicht zu beobachten. Häufig sind Eizellen der Reifestufe II. Inmitten der Ovars sind Bereiche zusammengefalteter Eihüllen zu erkennen, die rot färben (★; Vergrößerungen **a** und **b**: 42 ×).

Bildtafel 12: Unterschiedliche Stadien präovulatorischer Atresie im Ovar weiblicher Zebrabärblinge nach Belastung mit 100 µg/L Nonylphenol. **a:** und **b:** Corpus atreticum Typ 1. Die Thekazellschicht ist normal ausgebildet (→). Die Granulosazellen sind hypertroph und umrahmen die Oocyte (▶). In der degenerierenden Oocyte befinden sich noch Dotterreste (★; Vergrößerungen **a**: 200 ×; **b**: 150 ×). **c:** und **d:** Corpus atreticum Typ 2 (spätes Stadium). Zu erkennen ist die Hyperplasie der Thekazellen, die in das Follikellumen eindringen und es besetzen. Das Cytoplasma der Thekazellen enthält Dottertröpfchen (→). In der degenerierten Oocyte befinden sich Dotterrest (★; Vergrößerungen: **c**: 400 ×; **d**: 200 ×). **e:** und **f:** Corpus atreticum Typ 2. Thekazellen (▶) besetzen das Follikellumen und dringen in die degenerierende Oocyte (★) ein. → Markiert ist die Granulosazellschicht eines angrenzenden Follikels. In die Thekaschicht treten Blutkapillare ein (rechts unten in Bild **e** erkennbar; Vergrößerungen: **e**: 215 ×; **f**: 180 ×). **g:** und **h:** Degenerationserscheinungen der Oocyte. Eventueller Beginn des Atresiestadiums Typ 4. Das Follikelepithel ist verändert (▶). Die Dottertröpfchen sind im Zentrum der Oocyte lokalisiert (★; Vergrößerungen: **g**: 77 ×; **h**: 130 ×). **i:** Corpus atreticum Typ 4. Von der Oocyte sind nur noch Chorionreste (★) zu erkennen die gefaltet, kollabiert und in Stücken zwischen Falten von Follikelepithel liegen (→). Die folliculären Epithelzellen (→) liegen einem zentralen Bindegewebe (▶) auf (Vergrößerung: 830 ×). **j:** Corpus atreticum Typ 4. Von den Oocyten sind nur noch gefaltete und kollabierte Chorionaggregate zu erkennen (▶). Daneben sind noch die Umrisse einer degenerierten Oocyte sichtbar (★; Vergrößerung: 206 ×). **k:** Beginnendes Stadium des Corpus atreticum Typ 1; Hypertrophe Granulosazellen, die ein Sekret (→) in die Oocyte sezernieren (★). In den Granulosazellen sind die pyknotischen Zellkerne zu sehen (▶; Vergrößerung: 960 ×).

Bildtafel 13: Histologie des Hodens und der die Spermiogenese durchlaufenden Reifestadien mehrerer Zebrabärblingmännchen nach Belastung mit 100 µg/L Nonylphenol über den gesamten Lebenszyklus. Die unterschiedlichen Hodenzelltypen sind wie folgt gekennzeichnet: 0 = Stammzelle; 1 = primäre Spermatogonie; 2 = sekundäre Spermatogonie; 3 = primäre Spermatocyte (z. T. während der ersten meiotischen Teilung); 4 = sekundäre Spermatocyte (z. T. während der zweiten meiotischen Teilung); 5 = Spermatide; 6 = Spermium; **a:** und **b:** unreif erscheinender Hoden. Die Tubulusdurchmesser sind im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich verkleinert. Auffällig ist das weitgehende Fehlen von reifen Spermien innerhalb der Tubuluslumina (Vergrößerungen **a:** und **b:** 700 ×). **c:** und **d:** Die Tubuli seminiferi wirken im Vergleich zu den Kontrollen komprimiert und sind prall mit Spermien angefüllt (→; Vergrößerungen **c:** und **d:** 110 ×).

Bildtafel 14: *Beschreibung siehe Seite 75.*

Bildtafel 15: *Beschreibung siehe Seite 75.*

Bildtafel 12: Atresie

Bildtafel 13: Hoden 100 NP

Weibchen nach Belastung mit 17 β -Estradiol

Weibchen, die über ihr gesamtes Leben dem Hormon 17 β -Estradiol ausgesetzt waren, zeigten leichte Veränderungen in der Morphologie des Ovars im Vergleich zu den Kontrollen (Bildtafel 14). Auffällig war vor allem die Oocytenzusammensetzung des Ovars. Die Anzahl der Oocyten der Reifestufe III war deutlich erhöht (Bild 14a, b). Einige dieser Oocyten ließen allerdings bereits Anzeichen beginnender Atresie erkennen (Bild 14b). In der Gesamtgröße und Form schienen die Ovarien im Vergleich zu denen der Kontrolltiere nicht verändert. Auffällig war das Vorkommen degenerierter Oocyten der Reifestufe IV, erkennbar an dem bereits deutlich ausgebildeten, gelb färbenden Chorion (Bild 14c). Dieser Effekt konnte ausschließlich nach Belastung mit 17 β -Estradiol beobachtet werden.

Männchen nach Belastung mit 17 β -Estradiol

An den Hoden der mit 17 β -Estradiol behandelten Zebrabärblingsmännchen waren ähnliche Veränderungen zu beobachten wie bei den gegenüber Nonylphenol ($\geq 20 \mu\text{g/L}$) exponierten Fischen. Die Hoden wirkten in ihrer Gesamtmorphologie im Vergleich zu den Hoden der Kontrolltiere nicht verändert, zeigten aber in der Zusammensetzung der die Spermatogenese durchlaufenden Zellpopulationen deutliche Unterschiede (Bildtafel 15). Die Tubuli seminiferi waren prall mit Spermien angefüllt (Bild 15a, b). Häufiger waren sekundäre Spermatogonien und zum Teil auch primäre Spermatogonien zu finden (Bild 15c).

Bildtafeln siehe folgende Seiten:

Bildtafel 14: Querschnitt durch das Ovar von Zebrabärblingsweibchen, die über den gesamten Lebenszyklus mit 17 β -Estradiol behandelt wurden. **a:** Das Ovar enthält verhältnismäßig viele Oocyten der Reifestufe II und III. Unreife Eizellen (Reifestufe I) sind nur in geringen Mengen vor allem im peripheren Bereich des Ovars zu erkennen (Vergrößerung: 42 \times). **b:** Auch an diesem Anschnitt wird die Dominanz der Oocyten der Reifestufe III deutlich. Einige Oocyten zeigen degenerative Anzeichen (\star). Erkennbar ist auch eine Eizelle der Reifestufe IV mit deutlich ausgeprägtem gelb färbendem Chorion (\blacktriangleright ; Vergrößerung: 60 \times). **c:** Atretische Oocyte der Reifestufe IV mit gelb färbendem Chorion (\blacktriangleright ; Vergrößerung: 130 \times).

Bildtafel 15: Querschnitt durch den Hoden eines über den gesamten Lebenszyklus mit 17 β -Estradiol behandelten männlichen Zebrabärblings. Der Hoden ist dicht mit Spermien angefüllt. Zu erkennen sind die unterschiedlichen Spermatogenesestadien, die wie folgt gekennzeichnet sind: 0 = Stammzelle; 1 = primäre Spermatogonie; 2 = sekundäre Spermatogonie; 3 = primäre Spermatocyte (z. T. während der ersten meiotischen Teilung); 4 = sekundäre Spermatocyte (z. T. während der zweiten meiotischen Teilung); 5 = Spermide; 6 = Spermium; 7 = Sertoli-Zelle. **a:** Hohe Dichte an Spermien innerhalb des Lumens der Tubuli seminiferi (Vergrößerung: 370 \times). **b:** Zu erkennen sind, deutlich voneinander abgetrennt, die die Spermatogenese durchlaufenden Zellpopulationen (Vergrößerung: 550 \times). **c:** Die Anzahl primärer und sekundärer Spermatogonien ist im Verhältnis zu den anderen Spermatogenesestadien erhöht (Vergrößerung: 1600 \times).

Bildtafel 14: Ovar Estradiol

Bildtafel 15: Hoden Estradiol

Tabelle 3.2.7: Histologische Untersuchung der Ovarien von Zebrabärblingsweibchen nach kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol und 17 β -Estradiol im Life-Cycle-Test

	H ₂ O	DMSO	Nonylphenol			E2
			2 μ g/L	20 μ g/L	100 μ g/L	100 ng/L
Relative Größe des Ovars				++	+++	++
Organisation der Oocyten						
Gleiche Reifestufen in Gruppen	+	+	+	++	-	+
Anzahl der Oocyten						
Reifestufe I	+	+	+	+++	+++	+
Reifestufe II	+	+	+	+++	+++	+++
Reifestufe III	++	++	++	++	-	+
Atretische Follikel						
Corpus atreticum Typ 1	-	-	-	-	-	-
Corpus atreticum Typ 2	+	+	++	-	+++	-
Corpus atreticum Typ 3	-	-	-	-	+++	-
Corpus atreticum Typ4	-	-	-	-	+++	-
Corpus atreticum Typ 5	-	-	-	-	-	-
Schleimablagerungen	-	-	-	-	+++	-
Eihüllenablagerungen	-	-	-	-	++	-
Fehlen des Ovars	-	-	-	+	+	-
Ovotestes	-	-	-	-	-	-

++++	Merkmal sehr stark ausgeprägt
+++	stark ausgeprägt oder häufig
++	aufgeprägt oder regelmäßig vorkommend
+	wenig ausgeprägt oder selten
-	nicht vorhanden

3.2.2.11 Ultrastrukturelle Veränderungen der Leber nach Exposition gegenüber Nonylphenol und 17 β -Estradiol

Für die ultrastrukturelle Bewertung der durch Nonylphenol und 17 β -Estradiol hervorgerufenen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen wurden jeweils 10 Tiere aus jedem Ansatz des Life-Cycle-Versuchs untersucht. Das Geschlecht der untersuchten Tiere wurde makroskopisch bestimmt.

Bei den Tieren aus den Kontrollansätzen 0,02 % DMSO und Wasser war der für Zebrabärblinge typische Sexualdimorphismus der ca. 15 – 19 μ m großen polyedrischen Hepatocyten des Zebrabärblings deutlich zu erkennen. Die Geschlechter unterschieden sich vor allem in der Anordnung und Menge des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) und der Verteilung der Speicherstoffe.

Leber weiblicher unbelasteter Zebrabärblinge

Die Hepatocyten der weiblichen unbelasteten oder mit 0,02 % DMSO behandelten Zebrabärblinge waren im Vergleich zu den Leberzellen der männlichen Tiere reich an Organellen (Bildtafel 16, Bild a). Das rER bildete immer Stapel langgestreckter, nicht unterbrochener Lamellen (zum Teil über 20 in paralleler Anordnung) die den zentral gelegenen Kern umhüllten. Der ca. 5 µm große Zellkern enthielt meist nur sehr wenig Heterochromatin. Pro Hepatocytenquerschnitt konnten ca. 3 – 5 Golgi-Felder beobachtet werden, die aus flachen Zisternen aufgebaut waren. An den Golgi-Zisternen waren meist kleine Golgi-Vesikel zu erkennen, die mit mäßig elektronendichtem Material angefüllt waren. Die unmittelbar in der Nähe des rER lokalisierten, ca. 4,5 µm langen und 0,8 µm breiten Mitochondrien, waren von sphärischer bis länglicher Gestalt. Peroxisomen (ca. 0,2 – 1,8 µm groß) kamen meist in geringer Anzahl vor. Sie waren rund bis oval und erschienen nur schwach elektronendicht. Glykogen fand sich nur in geringen Mengen locker gespeichert in kleinen Arealen, dafür zeigten die meisten Zellen ein bis mehrere Lipidtropfen (Bildtafel 16, Bild a; Tab. 3.2.8).

Leber männlicher unbelasteter Zebrabärblinge

Im Vergleich zu den Weibchen waren die Hepatocyten der männlichen Zebrabärblinge bei annähernd gleicher Größe relativ arm an Organellen (Bildtafel 16, Bild b). Zu erkennen waren meist nur wenige Reihen kurzer rER-Zisternen. Mit den rER-Zisternen waren runde bis langgestreckte Mitochondrien von bis zu 3,5 µm Länge und 0,5 µm Breite assoziiert. Zum Teil kamen sphärische Peroxisomen (0,1 – 1 µm groß) in der Nähe des zentral gelegenen Kerns vor. Der Kern enthielt oft viel Heterochromatin und selten einen auffälligen Nucleolus. Golgi-Felder waren nur selten erkennbar und wirkten im Vergleich zu denen der Weibchen sehr klein. In der Peripherie der Zellen befanden sich meist ausgedehnte Glykogenfelder, die mit Ausnahme weniger Lysosomen, frei von Organellen waren. Lipideinschlüsse waren selten.

Bei beiden Geschlechtern waren glattes endoplasmatisches Retikulum, Lysosomen, mikrovesikuläre Körper und autophagische Vakuolen nur selten zu finden. Hieran änderte sich auch nach Belastung der Fische nichts (siehe auch Tab. 3.2.8).

Leber weiblicher Zebrabärblinge nach Belastung mit Nonylphenol (≥ 20 µg/L)

Nach Belastung weiblicher Zebrabärblinge mit ≥ 20 µg/L Nonylphenol fielen vor allem Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums und der Golgi-Apparate auf (Bildtafel 17, Bild a, b, c). Mit steigender Nonylphenol-Konzentration war neben dem Verlust der Stapelbildung eine zunehmende Fenestrierung des rER zu erkennen. Weiterhin war eine Erhöhung der Anzahl an Golgi-Feldern sowie ein Anstieg der Golgi-Vesikelbildung sichtbar (Bild 17a). Auffällig war die erhöhte Glykogenmenge in den Hepatocyten nach Belastung der Tiere mit

20 und 100 µg/L Nonylphenol (Bildtafel 17 und 18, Bild a). Beim Vergleich des Zellkerns sowie der Nucleoli ergaben sich keine wesentlichen Veränderungen zu den Kontroll-Hepatocyten. Eine Zunahme der Peroxisomen war nicht zu erkennen. In der Speicherstoffzusammensetzung war vor allem eine Erhöhung der Glykogenmenge im Vergleich zu den Kontrollen dokumentierbar (Bildtafel 17, 18; Bild a).

An den Hepatocyten der Zebrabärblingsweibchen, die über ihr gesamtes Leben mit 100 µg/L Nonylphenol belastet wurden, war zusätzlich eine starke Dilatation der Golgi-Zisternen, verbunden mit einer vermehrten Vesikelbildung zu erkennen (Bildtafel 18, Bild a, b, c). Membranwirbel konnten häufiger beobachtet werden (Bildtafel 18, Bild d).

Bei 50 % der mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten Zebrabärblingsweibchen konnte zusätzlich eine starke Dilatation verbunden mit einer starken Fragmentierung der rER-Zisternen dokumentiert werden (Bildtafel 18, Bild e, f; siehe auch Tab. 3.2.8).

Leber männlicher Zebrabärblinge nach Belastung mit Nonylphenol ≥ 20 µg/L

Bei den männlichen Zebrabärblingen fielen weitreichende ultrastrukturelle Veränderungen der Hepatocyten ebenfalls erst ab der Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol auf. Besonders deutliche Unterschiede zu den Kontrolltieren zeigten sich bei der Zusammensetzung und dem Aufbau des Proteinsyntheseapparates. Neben dem Anstieg der Menge des rauhen endoplasmatischen Retikulums, war vor allem eine zunehmende Fenestrierung und Fragmentierung dieses Organells erkennbar. An den Golgi-Feldern war eine verstärkte Vesikelbildung zu beobachten (Bildtafel 17, Bild b). Ab einer Belastung mit 100 µg/L konnte zusätzlich zu der starken Fragmentierung auch eine starke Dilatation der rER-Zisternen dokumentiert werden (Bildtafel 19).

Auch die Zusammensetzung der Speicherstoffe unterschied sich von den Kontrollzellen. Während eine dosisabhängige Abnahme des Glykogens zu erkennen war, konnten vermehrt Lipidtropfen in den Leberzellen der belasteten Fische nachgewiesen werden (Bildtafel 17, Bild b; Tab. 3.2.8). Häufig waren Membranwirbel zu beobachten, die bei den Kontrollzellen immer fehlten.

Siehe gegenüberliegende Seite:

Bildtafel 16: Hepatocyten unbelasteter Zebrabärblinge: **a:** eines weiblichen Tieres. Im Zellkern ist der Nucleolus deutlich zu erkennen. Heterochromatin ist um den Nucleolus und peripher an der inneren Kernmembran lokalisiert. Die Zellen sind reich an rauhem endoplasmatischem Retikulum, das in konzentrischen Kreisen um den Zellkern angeordnet ist. Zwischen den Zisternen des rER sind eine Vielzahl von Mitochondrien zu finden (Vergrößerung: 7480 ×). **b:** eines männlichen Tieres. Die Zellen sind dicht mit Glykogen angefüllt. Um den Kern ist nur wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum, umgeben von Mitochondrien, zu erkennen. Der Zellkern ist reich an Heterochromatin, der Nucleolus ist deutlich ausgeprägt (Vergrößerung: 7800 ×).

Bildtafel 17: Hepatocyten von, gegenüber 20 µg/L Nonylphenol exponierten Zebrabärblingen. **a:** Leberzellen eines weiblichen Fisches. Innerhalb der Zellen sind große Mengen an Glykogen zu finden. Der Zellkern ist unauffällig, der Nucleolus ist nicht erkennbar. Heterochromatin ist nur wenig zu sehen. Konzentrisch um den Kern ist rauhes endoplasmatisches Retikulum (rER) angeordnet. In Assoziation mit dem rER sind zahlreiche Mitochondrien erkennbar. Häufig sind Golgi-Felder ebenfalls in Kernnähe zu sehen, die durch ihre starke Vesikelbildung auffallen. In wenigen Zellen sind kleine Lipidansammlungen in Form von Lipidtropfen zu finden (Vergrößerung: 8100 ×). **b:** Leberzellen eines Zebrabärblingsmännchens. Innerhalb des Kerns ist der große Nucleolus deutlich zu erkennen. Um den Nucleolus ist wenig Heterochromatin angeordnet. Das rauhe endoplasmatische Retikulum ist stark fragmentiert und zum Teil dilatiert. Golgi-Felder sind in hoher Anzahl zu erkennen. Auffällig ist die große Menge an Glykogen, das peripher in den Zellen in Glykogenfeldern angelegt ist (Vergrößerung: 9200 ×).

Bildtafel Seite 84:

Bildtafel 18: Hepatocyten von, mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten Zebrabärblingsweibchen. **a:** Leberzellen eines weiblichen Fisches. In den Zellen sind große Mengen an Glykogen zu finden. Der Nucleolus ist deutlich erkennbar. Konzentrisch um den Kern ist das zum Teil fenestrierte rauhe endoplasmatische Retikulum (rER) angeordnet. Häufig sind ausgedehnte Golgi-Felder ebenfalls in Kernnähe zu erkennen, deren Zisternen dilatiert sind. An den Golgi-Zisternen ist eine starke Vesikelbildung zu sehen. Zwischen die rER-Zisternen sind zahlreiche Mitochondrien eingestreut. (Vergrößerung: 9545 ×). **b:** Golgi-Felder: die Golgi-Zisternen sind deutlich dilatiert (Vergrößerung: 8000 ×). **c:** Golgi-Feld: an den dilatierten Zisternen ist eine rege Bildung elektronendichter Vesikel zu erkennen (Vergrößerung: 15900 ×). **d:** Membranwirbel innerhalb eines Glykogenfeldes (Vergrößerung: 22500 ×). **e:** Stark dilatiertes rER assoziiert mit Mitochondrien eines männlichen Zebrabärblings (Vergrößerung: 5000 ×). **f:** Das rauhe endoplasmatische Retikulum ist stark fragmentiert und dilatiert. In Assoziation mit den rER Zisternen sind zahlreiche Mitochondrien erkennbar. Im Kern ist der Nucleolus deutlich zu sehen. Neben zahlreichen Glykogenfeldern sind wenige kleine Lipidtropfen erkennbar (Vergrößerung: 8690 ×).

Bildtafel 17: *Beschreibung siehe Seite 82.*

Bildtafel 18: *Beschreibung siehe Seite 82.*

Bildtafel 17: Hepatocyten 20 NP

Bildtafel 18: Hepatocyten 100 NP, Weibchen

Bildtafel 19: Hepatocyten 100 NP, Männchen

Bildtafel 19 a: Hepatocyten eines mit 100 µg/L Nonylphenol behandelten Zebraablingsmännchens. In den Zellen sind ausgedehnte Glykogenfelder erkennbar. Der Zellkern ist unauffällig, der Nucleolus ist deutlich erkennbar. Konzentrisch um den Kern ist rauhes endoplasmatisches Retikulum (rER) angeordnet. In Assoziation mit dem rER, das nicht in geordneten Stapeln angeordnet ist, sondern stark fragmentiert und fenestriert ist, sind zahlreiche Mitochondrien erkennbar. Die rER-Zisternen sind deutlich dilatiert. In Kernnähe sind zwei Golgi-Felder zu sehen, an denen elektronendichte Vesikel zu finden sind (Vergrößerung: 9000 ×).

Leber weiblicher Zebrabärblinge nach Behandlung mit 100 ng/L 17 β -Estradiol

An den Hepatocyten der gegenüber 100 ng/L 17 β -Estradiol exponierten Zebrabärblingsweibchen fielen ähnlich wie nach Nonylphenol-Behandlung vor allem Veränderungen des rauhen endoplasmatischen Retikulums und der Golgi-Felder auf (Bildtafel 20, Bild a, b). Auffällig war vor allem der Verlust der Stapelbildung des rER, verbunden mit der Fenestrierung der rER-Zisternen. Das rER war nicht wie bei den Kontrollzellen ausschließlich in Kernnähe lokalisiert, sondern erstreckte sich über die gesamte Zelle bis in die Peripherie. Eine vollständige Fragmentierung der Zisternen wie bei den Nonylphenol-behandelten Männchen war nicht zu erkennen. Golgi-Felder konnten häufiger dokumentiert werden. An den Golgi-Feldern zeigte sich eine starke Vesikelbildung (Bild 20a, b).

In der Zusammensetzung der Speicherstoffe unterschieden sich die Hepatocyten der 17 β -Estradiol-behandelten Tiere von den Kontrollen durch die starke Einlagerung von Lipid (Tab. 3.2.8).

Leber männlicher Zebrabärblinge nach Behandlung mit 100 ng/L 17 β -Estradiol

Die Leberzellen der 100 ng/L 17 β -Estradiol-behandelten Zebrabärblingsmännchen zeigten ähnliche Veränderungen wie die Zellen der gegenüber 100 μ g/L Nonylphenol exponierten Fischmännchen. Das rauhe endoplasmatische Retikulum war nicht wie bei den Kontrolltieren in geringen Mengen in Stapeln angeordnet, sondern in Form fragmentierter und dilatierter Zisternen über die Zelle verteilt (Bildtafel 20, Bild c, d).

In der Zusammensetzung der Speicherstoffe zeigte sich nur eine leichte Abnahme des Glykogengehaltes im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tab. 3.2.8).

Bildtafel 20: Hepatocyten von 17 β -Estradiol-belasteten Zebrabärblingen. **a:** und **b:** Leberzellen weiblicher Fische. **a:** Der Zellkern ist unauffällig, der Nucleolus ist deutlich erkennbar. Das zum Teil fenestrierte rauhe endoplasmatische Retikulum (rER) erstreckt sich über die gesamte Zelle. In Assoziation mit dem rER sind zahlreiche Mitochondrien erkennbar. Die sehr häufig sichtbaren Golgi-Felder zeigen eine starke Vesikelbildung. Im Bereich kleiner Glykogenfelder sind Ansammlungen von Lipidtropfen zu finden (Vergrößerung: **a:** 6000 \times ; **b:** 10700 \times). **c:** und **d:** Leberzellen männlicher Fische. Die im Umriß leicht veränderten Kerne enthalten unauffällige Nucleoli. Das stark fragmentierte rER erstreckt sich über die gesamte Zelle. Die rER-Zisternen sind stark dilatiert (siehe Einschub; Vergrößerung: 20000 \times). Die Golgi-Zisternen sind ebenfalls dilatiert. An den Golgi-Zisternen sind zahlreiche Golgi-Vesikel zu erkennen. Die Zellen enthalten im Vergleich zu den Zellen der weiblichen Tiere mehr Glykogen, jedoch im Vergleich zu den Kontrolltieren kleinere Glykogenfelder (Vergrößerungen: **c:** 6300 \times ; **d:** 11600 \times).

Bildtafel 20: Hepatocyten Estradiol

Tabelle 3.2.8: Ultrastrukturelle Untersuchung der Leber von Zebrabärblingen nach kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol ($\geq 20 \mu\text{g/L}$) und 100 ng/L 17β -Estradiol (E2) im Life-Cycle-Test.

	Weibchen			Männchen		
	Kontrolle	NP	E2	Kontrolle	NP	E2
Kern						
Unregelmäßige Kernumrisse	-	+	-	-	+	+
Heterochromatin	+	+	+	+	+	+
Verändertes Heterochromatinmuster	-	-	+	-	+	-
Mitochondrien						
Menge	++	+++	+++	++	+++	++
Heterogenität	+	+++	++	+	+++	++++
Assoziation mit ER	++	+++	++	++	+++	++
Peroxisomen						
Peroxisomencluster	-	+	-	-	-	-
rER						
Menge	+++	++++	+++	+	+++	++
Verlust der Stapelbildung	-	+++	+++	-	+++	++
Fenestrierung der rER-Zisternen	-	+++	+	-	++	++
Vesikulierung und/oder Fragmentierung	-	-	-	-	+++	+++
Bildung konzentrischer Membranwirbel	-	++	++	-	++	+
Dilatation der Zisternen	-	+	+	-	++	++
Golgi-Felder						
Menge	++	+++	++	+	+	+
Dilatation der Zisternen	-	+++	+	-	-	-
Erhöhte Vesikelbildung	+	+++	+++	-	+	++
Reservestoffe						
Lipidmenge	++	++	++++	+	++	+
Glykogenmenge	++	++	+	++++	++	+++
Glykogenosomen	-	+	-	-	-	-

++++ Merkmal sehr stark ausgeprägt
 +++ stark ausgeprägt oder häufig
 ++ aufgeprägt oder regelmäßig vorkommend
 + wenig ausgeprägt oder selten
 - nicht vorhanden

3.2.2.12 Veränderungen des Skeletts und des Schädels nach Exposition gegenüber Nonylphenol

Unbelastete Zebrabärblinge

Die während des gesamten Lebens im Wasser bzw. 0,02 % DMSO gehaltenen Tiere, hatten eine gerade Wirbelsäule innerhalb der die Wirbelkörper deutlich voneinander abgesetzt zu erkennen waren. Die Neural- und Hämialbögen waren deutlich als langgestreckte nach caudal

gerichtete Fortsätze sichtbar. Die Aufgabelung der Wirbelsäule im Bereich der Schwanzflosse war deutlich getrennt.

Zebrabärblinge nach Belastung $\geq 2 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol

Tiere, die über ihr gesamtes Leben der höchsten Nonylphenol-Konzentration ausgesetzt waren, zeigten starke Deformationen der Wirbelsäule als Ganzes, aber auch der Wirbelkörper im Einzelnen. Die Wirbelsäule war nicht langgestreckt wie bei den Kontrolltieren sondern stark verbogen. Oft war im Bereich der Schwanzwirbelsäule ein leichter Knick zu erkennen, der bereits an den lebenden Tieren während des Versuches beobachtet werden konnte (s. Kap. 3.2.2.3). Die Wirbelsäule zeigte keine so deutliche Gliederung wie die Wirbelsäule der Kontrolltiere. Die Wirbelkörper waren deutlich kleiner, dünner und deformiert. Dornfortsätze waren nur noch sehr schwach oder gar nicht mehr zu erkennen. Die Neural- und Hämalbögen waren stark verbogen und nicht so klar angeordnet wie bei den Kontrolltieren. Bei den belasteten Tieren fehlte die Aufgabelung der Wirbelsäule vor der Schwanzflosse. Die bei den Kontrollen deutlich getrennt angelegten Knochen waren hier verwachsen.

Bildtafel siehe nächste Seite:

Bildtafel 21: Skelette unbelasteter und mit unterschiedlichen Nonylphenol-Konzentrationen behandelte Zebrabärblinge. **a:** Skelett eines Kontrolltieres. Die Wirbelsäule ist gerade und die einzelnen Wirbelkörper sind deutlich gegeneinander abgesetzt (\rightarrow). Die Rippen sind gerade nach caudal gerichtet. Die Aufgliederung der Wirbelsäule im Bereich der Schwanzflosse ist deutlich zu erkennen (\blacktriangleright). **b:** Skelett eines über das gesamte Leben mit $2 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol behandelten Zebrabärblings. Die Wirbelkörper sind deutlich dünner als die der Kontrolltiere und erscheinen in ihrem Aufbau nicht mehr so deutlich gegliedert (\rightarrow). Die Rippen sind nicht mehr klar nach caudal gerichtet und zum Teil verbogen. Die Aufgliederung der Wirbelsäule im Schwanzbereich ist erkennbar (\blacktriangleright). **c:** und **d:** zeigen die Skelette zweier Zebrabärblinge, die über ihr gesamtes Leben mit $100 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol behandelt wurden. Die Wirbelsäule weist mehrere Biegungen auf. Die dünnen Wirbelkörper sind nicht mehr gegeneinander abgegrenzt sondern erscheinen verwachsen (\rightarrow). Hämal- und Neuralbögen sind gekrümmt und nicht mehr deutlich nach caudal gerichtet. Die Aufgliederung der Wirbelsäule im Bereich des Schwanzes ist nicht mehr zu erkennen (\blacktriangleright). **1.** Aufbau der Wirbelkörper eines Kontrolltieres. Die Wirbel sind deutlich gegeneinander abgegrenzt, Hämal- und Neuralbögen sind nach caudal gerichtet. **2.** Wirbelkörper eines mit $2 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol behandelten Tieres. Die Wirbelkörper sind deutlich dünner. **3.** Abschnitt der Wirbelsäule eines gegenüber $100 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol exponierten Zebrabärblings. Die Wirbelkörper erscheinen miteinander verschmolzen und dünner als die der Kontrolltiere. Hämal- und Neuralbögen sind verkürzt und nicht so stark caudal orientiert. Vergrößerungen (a, b, c und d): $3\times$.

Bildtafel 21: *Beschreibung siehe Seite 89.*

Bildtafel 22

3.2.3 Untersuchung der Wirkung von Nonylphenol im Early-Life-Stage-Test

Die folgende Early-Life-Stage-Untersuchung ist eine Ergänzung zum bereits beschriebenen Life-Cycle-Versuch. Daher wurden mit 2, 20 und 100 µg/L Nonylphenol die gleichen Testkonzentrationen gewählt und zusätzlich 200 µg/L Nonylphenol getestet. Als Kontrollen dienten eine 0,02 %ige DMSO-Lösung und Wasser. Nach dem Aussortieren der unbefruchteten Eier (Bildtafel 22, Bild a), wurden 20 befruchtete Eier (Bild 22b, c) gegenüber DMSO und Nonylphenol exponiert. Dies ermöglichte eine genaue Beobachtung jedes einzelnen Tieres und seiner Entwicklung. Innerhalb der ersten drei Lebensstage waren keine Schädigungen oder Veränderungen der Entwicklungsgeschwindigkeit zu beobachten (Bild 22c, d, i, e). Ab dem 3. Tag auftretende Schädigungen wurden in Tabelle 3.2.9 zusammengestellt und sind zum Teil in Bildtafel 22 dargestellt.

Tabelle 3.2.9: Ereignisse während der Early-Life-Stage-Untersuchung unter dem Einfluss von Nonylphenol, Wasser und DMSO. Dargestellt sind neben der Schlupfrate am 3. Tag nach Eiablage auftretende teratogene Schädigungen.

	H ₂ O	Nonylphenol				
		DMSO 0,02 %	2 µg/L	20 µg/L	100 µg/L	200 µg/L
Larvenanteil am 3. Tag nach Eiablage (%)	57	22	52	9	9	21
Verkrümmung der Schwanzwirbelsäule (%)	-	-	-	-	-	47
Krümmung der gesamten Wirbelsäule (%)	-	-	-	-	-	47
Starke Krümmung der Wirbelsäule (%)	-	-	-	-	-	6
Ödembildung am Perikard (%)	-	-	-	-	-	47
Völlige Verkrüppelung (%)	-	-	-	-	4	
Letalität (am 6. und 7. Tag nach Eiablage; %)	-	5	-	-	-	33
Herzfrequenz verlangsamt (%)	-	-	-	-	-	20
Aufrechtes Schwimmen nach:	4 d	4 d	4 d	4 d	6 d	6 d

Die bei 47 % der Tiere nach Exposition gegenüber 200 µg/L Nonylphenol auftretenden Verkrümmungen der gesamten Wirbelsäule waren bereits nach dem Schlupf der Larven zu erkennen, sind jedoch nicht mit den oftmals vorhandenen reversiblen Krümmungen, bedingt durch die Lage im Ei, zu verwechseln. Während diese ungeschädigten Tiere sich innerhalb eines Tage vollständig streckten, blieben die krankhaften Wirbelsäulenverkrümmungen wäh-

rend des gesamten Versuchszeitraumes erhalten. Tiere mit starker Krümmung waren zu keiner gerichteten Lokomotion fähig und starben am 5. und 6. Tag nach Eiablage.

Ödeme, hier nur Perikardödeme, bildeten sich erst ab dem 4. Tag nach der Eiablage und damit 1 - 2 Tage nach dem Schlüpfen der Tiere (Bild 22h, k und l). Zu Beginn waren die Perikardödeme ausschließlich auf die Herzregion beschränkt, dehnten sich jedoch nach einem Tag weiter caudal aus. Zusammen mit den Ödemen traten hier auch immer Wirbelsäulenverkrümmungen auf. Tiere mit Perikardödemen starben zu 70 % bereits zwei Tage nach Auftreten des Ödems (am 6. Tag nach Eiablage). Die verbleibenden 30 % der Larven starben einen Tag später.

Larven mit leichten Verkrümmungen der Wirbelsäule (Bild 22f), sowohl cranial als auch im Bereich der Schwanzwirbelsäule, schienen durch diese Schädigung nicht beeinträchtigt. Sie lebten bis Versuchsende und zeigten auch im Schwimmverhalten kaum Unterschiede zu den normal entwickelten Tieren.

Bei einem Tier konnten Augenanomalien festgestellt werden. Diese Larve hat neben einem normal entwickelten ein verkleinertes Auge (Bild 22i).

Bildtafel 22: Entwicklungsstadien unbelasteter und mit Nonylphenol belasteter Zebraablingslarven. **a:** Unbefruchtete Eizelle, ca. 6 h nach Eiablage (Vergrößerung: 54 ×). **b:** Embryo, ca. 6 h nach Eiablage (Vergrößerung: 54 ×). **c:** Gesunder Embryo, ca. 24 h nach Eiablage. Der Schwanz ist bereits abgelöst. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits heftige Spontanbewegungen zu beobachten. Eine Pigmentierung ist noch nicht zu sehen (Vergrößerung: 54 ×). **d:** Gehirnanlage eines normal entwickelten, ca. 48 h alten Embryos (→). Die deutlich ausgebildeten Augen und Ohren des gesunden Tieres sind deutlich zu erkennen (Vergrößerung: 150 ×). **e:** Wirbelsäule und Somiten eines 48 h alten Tieres (Vergrößerung: 230 ×). **f:** Schwach abgeknickte Wirbelsäule im hinteren Körperabschnitt einer ca. 3 Tage alten Zebraablingslarve nach Behandlung mit 200 µg/L Nonylphenol. Die Pigmentierung ist deutlich zu erkennen (Vergrößerung: 70 ×). **g:** Gesunde, ca. 3 Tage alte Zebraablingslarve. Von cranial beginnend sind die normal entwickelten und pigmentierten Augen, das Ohr mit dem Statolithen, Schwimmblase und darüber Wirbelsäule und Somiten zu erkennen (Vergrößerung: 91 ×). **h:** Ca. 3 Tage alte Larve mit Perikardödem (★) nach Belastung mit 200 µg/L Nonylphenol. Augen- und Ohrenanlagen sind normal entwickelt und die ventral gelegene Mundöffnung ist zu erkennen (Vergrößerung: 91 ×). **i:** Dorsalansicht einer ca. 4 Tage alten, aufschwimmenden Zebraablingslarve. Beide Augen sind normal ausgebildet (Vergrößerung: 43 ×). **j:** Dorsalansicht einer ebenfalls ca. 4 Tage alten Larve nach Behandlung mit 200 µg/L Nonylphenol. Um den Kopf der Larve sind noch die Reste der Eihülle zu erkennen. Das linke Auge ist im Vergleich zum rechten Auge unterentwickelt (Vergrößerung: 43 ×). **k** und **l:** Perikardödeme an ca. 5 Tage alten Zebraablingslarven, nach Belastung mit 200 µg/L Nonylphenol (★). In **l** ist schemenhaft das durchblutete Herz zu erkennen (Vergrößerungen: 162 ×).

Bildtafel 22: Embryotox.

3.2.4 Einfluss kurzzeitiger Belastung mit Nonylphenol auf das Geschlechterverhältnis

In einem weiteren Versuch sollte der Einfluss kurzzeitiger Nonylphenol-Exposition früher Lebensstadien des Zebraäbrblings auf die spätere Geschlechterausprägung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils 3×60 Eier, bzw. Larven, über ein Zeitfenster von einer Woche während der Embryonal- und Larvalphase mit $100 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol belastet. Nach den Belastungsphasen wurden die Tiere in unbelastetem Wasser bis zu Geschlechtsreife gehalten.

Bei den zu Versuchsende durchgeführten Reproduktionsversuchen waren keine Unterschiede in Eizahl und Befruchtungsrate zu den Kontrolltieren erkennbar. Auch das Geschlechterverhältnis blieb im Gegensatz zur Langzeitexposition gegenüber $100 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol im Life-Cycle-Test ausgeglichen.

3.2.5 Diskussion der Wirkung von Nonylphenol auf den Zebraäbrbling

In der vorliegenden Studie konnte die Wirkung von Nonylphenol auf den Zebraäbrbling (*Danio rerio*) in vielfältiger Weise gezeigt werden. Tiere, die über ihr gesamtes Leben 2 , 20 und $100 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol ausgesetzt waren, zeigten neben starken Veränderungen der Morphologie und des Verhaltens vor allem Störungen der Reproduktionsfähigkeit, im Sinne verringerter Eizahlen und Befruchtungsraten. Besonders auffällig waren die Veränderungen der Geschlechterzusammensetzung innerhalb der künstlichen Populationen der genannten Versuchsansätze. Nach histologischer und cytologischer Aufarbeitung der Versuchstiere wurden weitere durch Nonylphenol hervorgerufene Anomalien erkennbar. Neben der Schädigung der Ovarien einiger Tiere, beispielsweise vermehrt auftretender Atresie der Oocyten, fielen strukturelle Veränderungen der Hoden auf. Die Ultrastruktur der Hepatocyten belasteter Tiere war geprägt durch Veränderungen vorwiegend der Golgi-Felder und rER-Zisternen, vermutlich aufgrund der verstärkten Proteinsyntheseleistung der Zellen. Eine indirekte Wirkung des Nonylphenols zeigte sich an den Larven der F_2 -Generation, die, selbst unbelastet, vermutlich aufgrund der Beeinträchtigung der Elterntiere vermehrt unter Ödemen und Wirbelsäulen-anomalien litten. Missbildungen der Embryonen und Larven sowie histologische Veränderungen der Gonaden waren zum Teil bereits ab der Belastung mit $2 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol zu erkennen, einer Konzentration, die im Freiland oft an Kläranlagenabflüssen gemessen und überschritten wird. Aber nicht nur in der Nähe von Kläranlagen, sondern auch im Wasser von Flüssen und an Estuaren ist Nonylphenol, wenn auch oft in geringen Konzentrationen, nachweisbar (Naylor et al., 1992; Ahel et al., 1994a, b, c; Kvestak et al., 1994; Blackburn und Waldock, 1995; Kojima and Watanabe, 1998; Isobe et al., 1999; Tsuda et al., 2000). So bewegten sich beispielsweise die Nonylphenol-Werte nach der Untersuchung von 30 Flüssen Großbritanniens

zwischen 0,11 und 0,64 µg/L im freien Wasser, in Kläranlagenabflüssen waren Spitzenwerte von 180 µg/L Nonylphenol zu messen. Sogar im Trinkwasser Großbritanniens konnten Nonylphenol-Mengen von bis zu 1 µg/L nachgewiesen werden (Kubeck und Naylor, 1990; Clark et al., 1992; Talmage, 1994; Lee und Peart, 1995; Blackburn und Waldock, 1995).

Das es sich bei den Alkylphenolen, zu denen Octylphenol und Nonylphenol gehören, um Substanzen mit estrogenen Wirkung handelt, ist bereits seit einer von Dodd und Lawson 1938 durchgeführten Studie bekannt und konnte in einer Reihe neuerer Untersuchungen bestätigt werden (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., 1996a, b; Abraham und Frawley, 1997; 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). Grundlage einer Vielzahl dieser Studien war die Bewertung von Biomarkern wie die durch Xenooestrogene oder Estrogene hervorgerufene Induktion des Dottervorläuferproteins Vitellogenin oder die Produktion des Eihüllenproteins (*Zona radiata*) eierlegender Vertebraten (Arukwe et al., 1997, 1998; Patyna et al., 1999). Vollständige *In vivo*-Experimente sind bislang jedoch selten, obwohl sie oft schon nach kurzen Expositionszeiten vielschichtige Ergebnisse liefern können.

Bereits nach 14- bzw. 21-tägiger Exposition männlicher Medakas gegenüber Octylphenol (Gronen et al., 1999) bzw. Nonylphenol (Shioda und Wakabayashi, 2000) fielen beispielsweise neben histologischen Veränderungen nach Verpaarung belasteter Männchen mit unbelasteten Weibchen verminderte Eizahlen und Befruchtungsraten auf. Problematisch bei der Durchführung kurzzeitiger Expositionen ist, dass Fische äußeren Einflüssen nicht in jeder Phase ihres Lebens gleich empfindlich gegenüberstehen. Vielmehr gibt es gerade während der frühen Entwicklung Zeitfenster wie die Gonadenentwicklungsphase (bei Karpfen zwischen dem 50. und 110. Tag, Gimeno et al., 1997), während der die Tiere besonders empfindlich auf estrogenen Stimuli reagieren (Yokota et al., 2000). Life-Cycle-Versuche bieten die Möglichkeit, auch ohne die genaue Kenntnis sensibler Phasen eine zuverlässige Aussage über die Wirkungsweise eines Schadstoffes zu treffen. Ein weiterer Vorteil lebenslanger Belastung ist, dass eine weit größere Zahl unterschiedlicher Parameter miteinander abgeglichen werden kann und durch histologische, cytologische, biochemische, konditionelle und reproduktionsbiologische Untersuchungen ein vielschichtiges Bild entsteht.

Beim Vergleich der histologischen Veränderungen mit dem rückläufigen Reproduktionserfolg der hier untersuchten Zebrabärblinge wird die Aussagekraft des Life-Cycle-Experimentes am deutlichsten. Zebrabärblingmännchen, die über ihr gesamtes Leben unter dem Einfluss von Nonylphenol (≥ 2 µg/L) gehalten wurden, zeigten ähnliche Veränderungen der Hodenstruktur wie die von Christiansen et al. (1998a) wöchentlich mit 100 µg/g Nonylphenol gespritzten männlichen Aalmuttern. Während ein Teil der Zebrabärblinge vor allem nach Belastung mit 100 µg/L Nonylphenol Hoden hatten, die neben zahlreichen Spermatogonien keine Spermien erkennen ließen, zeigten sich die Tubuli seminiferi, anderer Zebrabärblingmännchen prall

mit Spermien angefüllt. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Christiansen et al. (1998a), die nach Nonylphenol-Behandlung ebenfalls Hoden mit prall angefüllten Lobuli seminiferi, aber auch degenerierte Hoden nachweisen konnten.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Unterscheidung zwischen Tubuli und Lobuli der Fischhoden, wie sie in zahlreichen Studien beschrieben ist, (Hoar, 1969; Dodd, 1972; Callard et al., 1978; Hoar und Nagahama, 1978; Nagahama, 1983) keine Gültigkeit mehr hat (Grier et al., 1980, Grier, 1981). Nach Grier et al. (1980) sind somit die Hoden fast aller Fischarten in Form des unbegrenzten, spermatogonialen Testis-Typ organisiert, dem der begrenzte spermatogoniale Testis-Typ der Atheriniformes gegenübersteht. In beiden Hodentypen läuft die Spermatogenese in Cysten ab, die von den Sertoli-Zellen geformt werden (Grier et al., 1980; Grier, 1981).

Christiansen et al. (1998a) treffen über die möglichen Konsequenzen der histologischen Veränderungen der Hoden für die Reproduktionsfähigkeit der belasteten Aalmutter keine Aussage. Die Vielschichtigkeit der Ergebnisse des hier vorgestellten Life-Cycle-Versuchs macht jedoch eine Korrelation der zunehmenden histologischen Veränderungen der Hoden mit der kontinuierlichen Abnahme der Reproduktionsfähigkeit der männlichen Tiere möglich. So zeigten bereits die Zebraabärblingsmännchen, die über ihr gesamtes Leben mit 2 µg/L Nonylphenol belastet worden waren, neben leichten Veränderungen der Hoden im Vergleich zu den Kontrolltieren, signifikante Verringerungen der Befruchtungsraten. Ein vollständiges Erliegen der Reproduktionsfähigkeit konnte nach kontinuierlicher Exposition der Fischmännchen gegenüber 100 µg/L Nonylphenol beschrieben werden. Die Hoden dieser Tiere wiesen starke strukturelle Veränderungen auf.

Wie die Beeinflussung durch Nonylphenol stattgefunden hat, ist unklar, und über die genauen Wirkungsmechanismen lässt sich keine feste Aussage treffen. Für die Verringerung der Befruchtungsraten könnte jedoch eine verminderte Anzahl abgegebener Spermien in Frage kommen (Kime und Nash, 1999). Da aber kein Beweis für eine Verminderung der abgegebenen Spermienmenge vorliegt, müssen weitere mögliche Ursachen, die zu einer Beeinträchtigung des Reproduktionserfolges geführt haben können, in Betracht gezogen werden. Der Einfluss von Nonylphenol könnte bei den Männchen auch zu einer verminderten Spermienqualität geführt haben (Kime und Nash, 1999), wie sie bereits für viele Xenoestrogene in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Tierarten gezeigt werden konnte (Sharpe and Skakkebak 1993; Sharpe, 1993; Guillette et al., 1994; Sharpe et al., 1995; Jobling et al., 1996; Toppari et al., 1996; Christiansen et al., 1998a).

Die Verminderung der Spermienqualität ist in erster Linie in einer Störung des Hormonmilieus zu suchen. Denn stimmt das korrekte Hormonmilieu nicht, ist auch die Qualität der produzierten Gameten nicht mehr gewährleistet (Kime und Nash, 1999). Die Beeinflussung des Hormonkreislaufes könnte auch der Grund für die beobachteten Veränderungen des Balzverhaltens der gegenüber 100 µg/L Nonylphenol exponierten Zebraabärblinge gewesen sein und

daraus resultierend für das Ausbleiben des Reproduktionserfolges selbst in Kombination mit den Kontrollweibchen. Auch Gronen et al. (1999) vermuten ein verändertes Balzverhalten als Ursache für die erfolglose Reproduktion Octylphenol-exponierter ($\geq 20 \mu\text{g/L}$) Medakamännchen nach Verpaaren mit Kontrollweibchen. Als möglicher Mechanismus für das modifizierte oder vollständig ausbleibende Balzverhalten wäre, ähnlich wie für Octylphenol an Ratten beschrieben (Blake und Boockfor, 1997), eine Verminderung des Testosterongehalts im Blut denkbar. Diese kann eine Beeinflussung des Verhaltens über das Gehirn nach sich ziehen. Veränderungen von Testosterongehalt und Gonadotropinausschüttung bewirkten bei Schweinen eine Verringerung der Größe der Hodentubuli (Trudeau et al., 1992), wie sie auch bei den mit $100 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol behandelten Zebraärbliingsmännchen nachgewiesen werden konnte. Inwieweit Veränderungen des Testosteronspiegels das Reproduktionsverhalten von Fischen beeinflussen können, ist bislang allerdings noch nicht endgültig geklärt (Gronen et al., 1999). Ergebnisse aus frühen Untersuchungen, in denen Verhaltensänderungen nach exogener Gabe von Steroiden wie Testosteron und Estradiol bei einer Reihe von Fischarten beobachtet werden konnten, bieten aber die Grundlage für ein besseres Verständnis der Xenöestrogenwirkung. So konnte beispielsweise van den Hurk (1982) nach Gabe von 17β -Estradiol eine Verringerung der reproduktiven Aktivität bei Zebraärbliingen, hervorgerufen durch die Hemmung der Steroidsynthese, beobachten. Nach Gabe von Testosteron war eine Unterdrückung der Steroidsynthese, aber keine Veränderungen im Balzverhalten zu beobachten. Auch wenn diese Beobachtungen zunächst überraschend waren, führten doch weitere Untersuchungen an kastrierten Zebraärbliingsmännchen zu einer plausiblen Theorie. So sind nämlich nicht, wie zunächst angenommen, die gonodalen Steroide, sondern vielmehr die von der Hypophyse gebildeten Gonadotropine im wesentlichen für die Modulation des Verhaltens verantwortlich (van den Hurk, 1982). Dies bedeutet für die vorliegende Studie, dass es durch den Einfluss von Nonylphenol über den negativen Rückkopplungsmechanismus auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse der männlichen Fische zunächst zu einer Reduktion der Gonadotropinausschüttung und daraus resultierend zu einer verminderten Steroidsynthese in den Hoden gekommen sein könnte (siehe Abb. 3.2.13). Da Alkylphenole über eine rezeptorvermittelte Reaktion als 17β -Estradiol-Agonisten bei der Stimulation der Vitellogenese der Leber wirken (White et al., 1994), ist auch eine Reaktion auf andere, estrogenrezeptortragende Organe der Hormonkaskade wie Hypothalamus und Hypophyse denkbar (Pakdel et al., 1989; Salbert et al., 1993; Kime et al., 1999; Yadetie, 1999).

Für eine hormonelle Beeinflussung durch Nonylphenol sprechen vor allem auch die an den Zebraärbliingsweibchen beobachteten histologischen Befunde. An den Ovarien dieser Tiere war nach Belastung mit 20 und $100 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol und 100 ng/L 17β -Estradiol neben dem vermehrten Auftreten follikulärer Atresie eine veränderte Oocytenzusammensetzung im Vergleich zu den Kontrollweibchen zu beobachten. Atresie tritt zwar zum Teil auch bei unbelasteten Tieren auf (Billard und Takashima, 1983; Takashima, 1986) und kann als toxische Reaktion durch verschiedene Schadstoff hervorgerufen werden (Donaldson, 1990; Dierschke

et al., 1994), doch kennt man diese Degenerationserscheinung bei Säugetieren vor allem nach auffälligen Hormonveränderungen (Junqueira und Carneiro, 1991). Als Hauptauslöser follikulärer Atresie gelten vor allem die Estrogene (Dierschke et al., 1994). Bei Fischen ist das Auftreten von Atresie bei physiologisch gesunden Weibchen sehr ungewöhnlich (Wallace und Selman, 1981; Papoulias et al., 1999) und kann vor allem während der natürlichen Geschlechtsumkehr bei hermaphroditen Arten (Chan et al., 1967; Kaipia und Hsueh, 1997) beschrieben werden. Auch kennt man diese Veränderung beispielsweise an Zebrabärblingen und Medakas nach exogener Gabe von 17β -Estradiol oder estrogenähnlich wirkenden Substanzen wie Octylphenol (Gray et al., 1999; Gray und Metcalfe, 1999; Olsson et al., 1999).

Wie genau die Wirkung der exogenen Xeno-(Estrogene) auf den Hormonmetabolismus aussieht, ist nicht geklärt. Doch scheinen Studien, in denen nach artifizieller Hemmung der Gonadotropinsynthese (van Ree, 1975; Pawar und Katdare, 1983) ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von Atresie zu verzeichnen war, die Hypothese von einer durch Nonylphenol bedingten Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (Abb. 3.2.13, 3.2.14) bei den Zebrabärblingen zu bestätigen. Für Octylphenol jedenfalls, das bei Medakas zu einer erhöhten Atresierate geführt hatte (Gray und Metcalfe 1999), konnte eine hemmende Wirkung auf die Gonadotropinsynthese männlicher Ratten bereits nachgewiesen werden (Blake und Bookfor, 1997).

Aber nicht allein das vermehrte Auftreten atretischer Follikel, sondern auch die bereits erwähnte Veränderung der Oocytenzusammensetzung der mit $\geq 20 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol und 100 ng/L 17β -Estradiol belasteten Zebrabärblinge deutet auf eine Blockade der Gonadotropinsynthese hin (van Ree, 1975; Sukumar und Karpagaganapathy, 1992). Bei diesen Fischen war eine Zunahme prävitellogener und eine Abnahme postvitellogener Oocyten in ähnlicher Weise wie bei Dickkopfelritzen nach 17β -Estradiol-Belastung (Miles-Richardson et al., 1999b), zu beobachten. Eine Blockade der GtH-II Sekretion durch exogen zugegebenes 17β -Estradiol ist bei Regenbogenforellen bereits beschrieben (Chyb et al., 1999). Eventuell könnte auch das Auftreten eckiger Oocyten, wie sie in den Ovarien der gegenüber $100 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol und 100 ng/L 17β -Estradiol exponierten Zebrabärblingsweibchen bereits makroskopisch nachweisbar waren und von Sukumar und Karpagaganapathy (1992) nach Carbofuran-Belastung an Zwergfadenfischen beschrieben wurde, ein Hinweis auf die Hemmung der Gonadotropinsynthese sein (Sukumar und Karpagaganapathy, 1992).

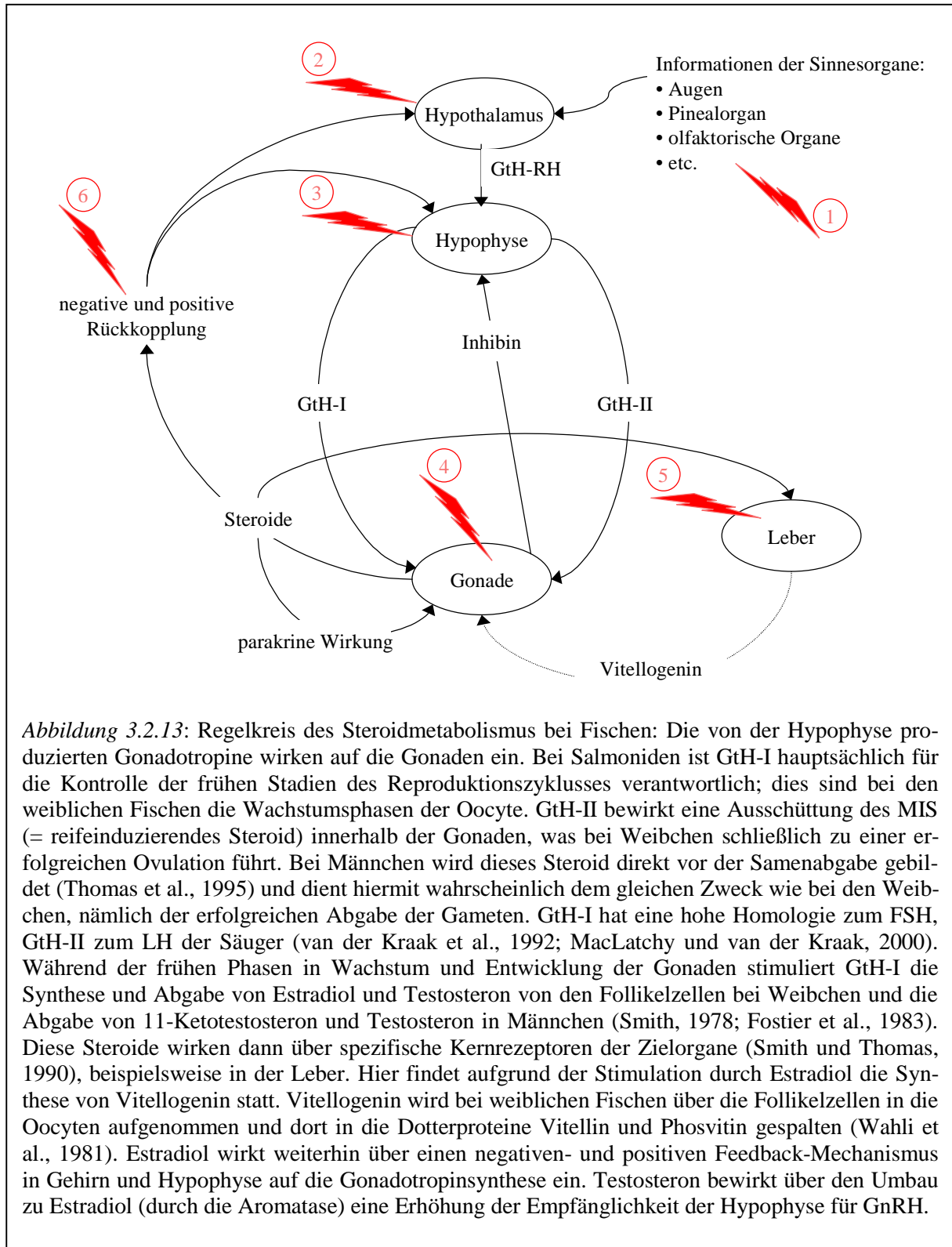


Abbildung 3.2.13: Regelkreis des Steroidmetabolismus bei Fischen: Die von der Hypophyse produzierten Gonadotropine wirken auf die Gonaden ein. Bei Salmoniden ist GnH-I hauptsächlich für die Kontrolle der frühen Stadien des Reproduktionszyklusses verantwortlich; dies sind bei den weiblichen Fischen die Wachstumsphasen der Oocyte. GnH-II bewirkt eine Ausschüttung des MIS (= reifeinduzierendes Steroid) innerhalb der Gonaden, was bei Weibchen schließlich zu einer erfolgreichen Ovulation führt. Bei Männchen wird dieses Steroid direkt vor der Samenabgabe gebildet (Thomas et al., 1995) und dient hiermit wahrscheinlich dem gleichen Zweck wie bei den Weibchen, nämlich der erfolgreichen Abgabe der Gameten. GnH-I hat eine hohe Homologie zum FSH, GnH-II zum LH der Säuger (van der Kraak et al., 1992; MacLatchy und van der Kraak, 2000). Während der frühen Phasen in Wachstum und Entwicklung der Gonaden stimuliert GnH-I die Synthese und Abgabe von Estradiol und Testosteron von den Follikelzellen bei Weibchen und die Abgabe von 11-Ketotestosteron und Testosteron in Männchen (Smith, 1978; Fostier et al., 1983). Diese Steroide wirken dann über spezifische Kernrezeptoren der Zielorgane (Smith und Thomas, 1990), beispielsweise in der Leber. Hier findet aufgrund der Stimulation durch Estradiol die Synthese von Vitellogenin statt. Vitellogenin wird bei weiblichen Fischen über die Follikelzellen in die Oocyten aufgenommen und dort in die Dotterproteine Vitellin und Phosvitin gespalten (Wahli et al., 1981). Estradiol wirkt weiterhin über einen negativen- und positiven Feedback-Mechanismus in Gehirn und Hypophyse auf die Gonadotropinsynthese ein. Testosteron bewirkt über den Umbau zu Estradiol (durch die Aromatase) eine Erhöhung der Empfänglichkeit der Hypophyse für GnRH.

Abbildung: 3.2.14. Mögliche Wirkungsweisen von Xenoestrogenen auf die Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden-Achse (Mattison et al., 1983; Thomas, 1990; van der Kraak et al., 1992):

1. Erkennung der Chemikalien durch die peripheren Sinnesorgane.
2. Eingriff in die neuronale Aktivität des Hypothalamus über die Veränderung der Neurotransmitterfunktion (Seegal et al., 1986; Khan und Thomas, 1996). Veränderungen der hypothalamischen Neurotransmitteraktivität können die GnRH-Ausschüttung beeinflussen, und damit sekundär auch die GtH-Bildung der Hypophyse (Cicero et al., 1977).
3. Direkte Wirkung auf die Hypophyse durch die Beeinflussung der Signaltransduktion und damit der Gonadotropin I- und II-Ausschüttung (Cooper et al., 1987; Thomas, 1993). Durch die Wirkung der Chemikalien auf die GtH-Abgabe kommt es zu Änderungen der Steroidsekretion und der gonodalen Funktion (Thomas, 1989).
4. Direkte Wirkung auf die Gonaden durch die Störung des Second messenger-Systems und steroidogener Enzyme (Sangalang und O'Halloran, 1973; Singhal et al., 1985; Phelps und Laskey, 1989; van der Kraak et al., 1992).
5. a. Induktion von P450 Enzymen in der Leber; hierdurch kann es zu erhöhtem Abbau der Steroide und damit zu Veränderungen des Plasmasteroidgehaltes und der Steroidfunktion kommen (Sivarajah et al., 1978; Yano und Matsayama, 1986). Die Folge können Veränderungen der Menge des Estrogenrezeptors und der Vitellogeninproduktion sein.
b. Direkte Wirkung der Chemikalien über eine estrogenrezeptorvermittelte Reaktion mit der Folge vermehrter Vitellogeninbildung und -ausschüttung (White et al., 1994; Blake und Boockfor, 1997).
6. Wirkung über den Feedback-Mechanismus auf Hypothalamus und Hypophyse, entweder indirekt über Veränderungen des zirkulierenden Steroidgehaltes oder direkt im Sinne agonistischer oder antagonistischer Bindung an Steroidrezeptoren (Bulger und Kupfer, 1985; Huang und Nelson, 1986; Thomas und Smith, 1993). Einen positiven Feedback üben die Steroide Testosteron und 17β -Estradiol normalerweise bis zur beginnenden Gametogenese auf die Synthese von GtH-I und GtH-II aus (Breton et al., 1997). Während der Gametogenese wirkt E2 über einen negativen Feedback auf die GtH-I Sekretion (Larsen und Swanson, 1997; Saligault et al., 1998). Auf GtH-II hat E2 einen indirekt positiven oder negativen Effekt über die Modulation einer E2-aktivierten dopamininhibitorischen Tonus (Saligault et al., 1998). Nach der Ovulation geht die GtH-I-Ausschüttung stark nach oben, während das GtH-II-Niveau gleich bleibt. E2 bewirkt eine Hemmung der GtH-II Sekretion, aber nicht der GtH-I Sekretion (Chyb et al., 1999).

Durch Chemikalien induzierte Veränderungen auf einem Niveau der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse ziehen zwangsläufig auch die Aktivitätsveränderungen auf anderen Ebenen dieser Achse mit sich (Thomas und Khan, 1995).

Wie es zu den Veränderungen innerhalb des Ovars kommen kann, wird klar, wenn man die Aufgabe der Gonadotropine bei Teleostern näher betrachtet. Entsprechend den Säugetieren findet man auch bei Fischen zwei Hypophysenhormone, die für die Aufrechterhaltung der Hoden- und Ovarientätigkeit verantwortlich sind. GtH-I regelt in ähnlicher Weise wie das follikelstimulierende Hormon der Säugetiere bei weiblichen Fischen das Follikelwachstum und bei Männchen die Spermatozytendifferenzierung. Dem zweiten Gonadotropin (GtH-II), kommt bei weiblichen Fischen, ähnlich dem Säuger-LH (luteinisierendes Hormon), die Regelung der Ovulation und Sekretion eines reifeinduzierenden Steroids (MIS; bei Säugern = Progesteron) zu; bei männlichen Fischen wirkt es auf Synthese und Sekretion von Testosteron (Patiño, 1997; Trudeau, 1997). Die bei den belasteten Zebraabräblingsweibchen beobachtete erhöhte Atresierate, vor allem nach Belastungen mit 100 µg/L Nonylphenol, könnte, unter der Annahme, dass sich Nonylphenol tatsächlich störend auf die Gonadotropinsynthese ausgewirkt hat, durch eine verminderte bzw. fehlende Wirkung von GtH-II hervorgerufen worden sein. Durch den fehlenden Einfluss von GtH-II könnte es dann zu einer Blockade der Eiablage und in deren Folge zu einer Degeneration reifer Oocyten gekommen sein (Mylonas et al., 1997a, b; Kime, 1999). Denn während die Entwicklung und Teilung der Oogonien (mitotische Teilung), die Produktion neuer Oocyten (Oogenese) und die ersten Wachstumsphasen der Oocyte autonom sind, bedürfen Vitellogenese und die Vollendung der meiotischen Teilung einer Steuerung durch die Hypophyse (van Ree, 1975).

Gonadotropine sind, wie erwähnt, nicht nur als Regulatoren der Keimzellreifung weiblicher Tiere unabdingbar, auch bei Männchen fungieren sie als wichtige Induktoren von Spermatozytendifferenzierung und -abgabe. Die deutliche Zunahme von Spermato gonien in den Hoden der mit 100 µg/L Nonylphenol belasteten Zebraabräblinge, wie sie auch in anderen Studien an Regenbogenforellen (Jobling et al., 1996), Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*; Miles-Richardson et al., 1999b) und Meerbrassen (*Sparus aurata*; Condeça und Canario, 1999) nach Nonylphenol- bzw. 17β-Estradiol-Exposition gezeigt werden konnte, ist ein Hinweis für die Störung der Gonadotropinsynthese (Matty, 1985; Jobling et al., 1996). Auch das Fehlen von Spermien in den Hoden einiger gegenüber 100 µg/L Nonylphenol-exponierter Zebraabräblinge, wie es auch nach Gabe von 17β-Estradiol an Regenbogenforellen beobachtet werden konnte (Billard et al., 1981), spricht für eine Störung des normalen Ablaufes der Keimzellreifung, wahrscheinlich bedingt durch die Beeinflussung der Gonadotropinsynthese über einen möglichen Eingriff in den Feedbackmechanismus (Sumpter et al., 1996; Kime et al., 1999a). Durch den möglichen Einfluss von Nonylphenol auf die Hypophyse könnte es also zu einer Hemmung der GtH-II Sekretion und damit zu einem Ausbleiben der Entwicklung der letzten Reifestadien der Spermatogenese gekommen sein.

Kommt es zu einer Blockade der Spermatogenese, werden die sich nicht mehr weiter entwickelnden Keimzellen degenerieren (Miles-Richardson et al., 1999b). Da die Sertoli-Zellen eine wichtige Rolle bei der Phagozytose der degenerierten Keimzellen spielen (Hunter und Donaldson, 1983; Lofts, 1987; Miles-Richardson et al., 1999b), kann es zu einer Proliferation

dieses Zelltypes kommen, wie sie Miles-Richardson et al. (1999b) beschreiben. Eine leichte Zunahme der Sertoli-Zellen schien auch bei den mit Nonylphenol exponierten Zebrabärblingmännchen stattgefunden zu haben. Aus den lichtmikroskopischen Untersuchungen an den Zebrabärblingshodern wird nicht klar, ob auch weiter entwickelte Keimzellen resorbiert wurden. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Hoden von E2-behandelten Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) zeigen aber das Vorhandensein Spermatozoen-phagozytischer Sertoli-Zellen (Christiansen et al., 1998). Entsprechend der Vermutung von Condeça und Cainiro (1999) könnte das Fehlen von Spermien in den Hoden der belasteten Zebrabärblinge durch die Phagozytose durch Sertoli-Zellen erklärt werden.

Da die genaue Ursache der in zahlreichen Studien (Wester und Canton, 1986; Trudeau et al., 1992; Lye et al., 1997; Gray et al., 1999; Miles-Richardson et al., 1999b; Kinnberg et al., 2000) beobachteten Hodenstrukturveränderungen bislang jedoch noch nicht sicher geklärt ist (Christiansen et al., 1998a), müssen auch noch weitere mögliche Wirkungswege von Nonylphenol in Betracht gezogen werden. So ist beispielsweise bei den männlichen Tieren auch ein direkter Wirkmechanismus estrogener Stoffe auf die Hodenzellen denkbar (Christiansen et al., 1998a). Von besonderer Bedeutung sind hierbei wieder die Sertolizellen, deren Hauptaufgabe die Regulation der Spermiogenese darstellt (Russel, 1980; Dubois und Callard, 1989; Pudney, 1995; Christiansen et al., 1998a). Eine Störung der normalen Funktion dieser Zellen, die bei Säugetieren (Nakhla et al., 1984) und vermutlich auch bei Fischen (Dubois und Callard, 1989) Estrogenrezeptoren in ihrem Kern tragen (Pelletier et al., 2000), kann sich daher verändernd auf die Hodenstruktur auswirken (Christiansen et al., 1998a). Eine Beeinflussung der Sertolizellen durch 17β -Estradiol und Nonylphenol beschreiben Christiansen et al. (1998a). Auch Colombo und Grandi (1995) konnten an Aalen eine durch 17β -Estradiol hervorgerufene Sertolizellschädigung dokumentieren. Aber nicht allein die indirekte und direkte Wirkung estrogener Stoffe auf die Estrogenproduktion kann sich in einer Funktionsstörung der Sertolizellen und damit auf die Hodenstruktur auswirken; auch eine direkte Hemmung der Androgensynthese, ausgelöst durch estrogene Stoffe, erscheint denkbar (Trudeau, et al., 1993; Abb. 3.2.13, 3.2.14). Auch wenn bei der Wirkung von Nonylphenol in der vorliegenden Studie ein toxischer Mechanismus nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, deuten doch die beobachteten Befunde, vor allem auch im Vergleich mit den an 17β -Estradiol-behandelten Fischen gezeigten Effekten, eher auf eine hormonelle Beeinträchtigung der Tiere hin.

In der vorliegenden Studie wurde deutlich, dass Männchen sensibler auf exogene Störungen durch estrogene Substanzen reagieren als Weibchen. Denn während Veränderungen der Oocytenzusammensetzung erst ab einer Belastung mit $20 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol zu beobachten waren, zeigten sich histologische Unterschiede der Hodenstruktur im Vergleich zu den Kontrolltieren bereits ab $2 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol. Diese Beobachtung deckt sich mit einer Studie von Miles-Richardson et al. (1999a). Auch hier konnte nach 42tägiger Exposition von Dickkopflritzen gegenüber Nonylphenolkonzentrationen $\leq 5,5 \mu\text{g/L}$ keine Zunahme primärer, d. h. prävitellogener Follikel beobachtet werden. Erst nach 2wöchiger Exposition gegenüber $0,1, 2$

und 10 nM 17 β -Estradiol war bei der gleichen Fischart eine signifikante Zunahme primärer Follikel zu sehen (Miles-Richardson et al., 1999b). Im Unterschied zu den Nonylphenol exponierten weiblichen Tieren waren bei dem männlichen Dickkopfelritzen jedoch bereits deutliche Effekte nach Exposition gegenüber 1,1 und 3,4 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol zu beobachten (Miles-Richardson et al., 1999a). Eine höhere Sensibilität der Männchen gegenüber Nonylphenol erklären Giesy et al. (2000) wie folgt: Da 17 β -Estradiol normalerweise viel häufiger und in höheren Mengen im Plasma weiblicher Fisch zu finden ist und Nonylphenol eine deutlich schwächere estrogenische Wirkung hat als das Hormon selbst (White et al., 1994; Servos, 1999), bedarf es wahrscheinlich höherer Dosen, um Veränderungen in der Zusammensetzung der Follikelstadien zu bewirken (Giesy et al., 2000).

Inwieweit sich der verringerte Reproduktionserfolg im Sinne verminderter Befruchtungsraten der belasteten männlichen Zebraabrlinge auf die Population auswirken kann, ist nicht klar. Sicher scheint jedoch, dass die geringfügige Reduktion der Eizahl, wie sie nach Behandlung der Fische mit 2 und 20 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol und 100 ng/L 17 β -Estradiol beobachtet werden konnte, keine dramatischen Auswirkung auf den Fortbestand der Population haben kann (Schäfers et al., 1989). Diese Hypothese wird von dem Ergebnis einer speziell für den Zebraabrling entwickelten Computersimulation gestützt (Oertel et al., 1991), wonach die Anzahl der produzierten Eier nicht der relevanteste Parameter für den Fortbestand der Zebraabrlingspopulation ist. Entsprechend der Simulation scheint nicht einmal die Verringerung der Eizahl um ca. 50 % den Fortbestand der Zebraabrlingspopulation zu gefährden. Da die Computersimulationen auf Laborexperimenten mit Populationen limitierter Größe beruhen, ist eine Anwendung dieser Daten auf das Freiland bislang aber noch fraglich.

Die Gesundheit der Nachkommen ist ein weiteres wichtiges Kriterium für den Fortbestand einer Population. In der vorgestellten Studie konnten an 30 % der untersuchten Larven, deren Eltern gegenüber 20 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol exponiert worden waren, Ödeme und an 20 % der Tiere Wirbelsäulenanomalien festgestellt werden. Dieser Umstand erscheint zunächst erstaunlich, da die Embryonen und Larven dieser F₂-Generation selbst nicht belastet waren und bei ihren belasteten Eltern in der Larvalphase nur selten Ödeme und Wirbelsäulenanomalien aufgetreten waren. Berücksichtigt man jedoch, dass der Embryo seine Entwicklungsinformation über den Dotter erhält (Bern und Nishioka, 1993), erscheint die Zunahme der Entwicklungsanomalien nicht weiter überraschend. Im Unterschied zu den Tieren der F₁-Generation, die von ihren unbelasteten Eltern wahrscheinlich einen weitgehend schadstofffreien Dotter erhalten hatten und gegen die exogene Wirkung des Nonylphenol durch das Chorion teilweise geschützt waren (Blaxter, 1969), könnte bei den Embryonen und Larven der F₂-Generation eine Anreicherung des lipophilen und daher zur Bioakkumulation neigenden Nonylphenols (Ekelund et al., 1990; Ahel und Giger, 1993; Ahel et al., 1993) im Dotter zu einer Schädigung geführt haben. Eine solche Weitergabe lipophiler Substanzen durch die Mutter ist in zahlreichen Studien an Fischen beschrieben (Freeman und Idler, 1975; Niimi, 1983; McMaster et al., 1992). Die Akkumulation von Schadstoffen wie estrogen aktive chlorierte Kohlenwasserstoff-

fe im Dotter wird von vielen Autoren auch für das erhöhte Auftreten von Entwicklungsanomalien an Wildtieren wie Vögeln, Reptilien und Fischen verantwortlich gemacht (Nimii, 1983; McMaster et al., 1992; Review bei Vos et al., 2000). So konnten beispielsweise vermehrt deformierte Fischlarven in der mit chlorierten Kohlenwasserstoffen belasteten Ostsee (von Westernhagen et al., 1988a) und missgebildete Embryonen aus pelagischen Eiern in stark verschmutzten Bereichen der Nordsee beobachtet werden (Cameron et al., 1992). Bislang ist jedoch noch nicht klar, ob alle im Freiland beobachteten Effekt auf endokrin wirksame Stoffe zurückzuführen sind, oder ob auch andere Umweltfaktoren dafür verantwortlich zu machen sind (Dethlefsen et al., 1996). Auch die in der vorliegenden Studie beschriebenen Entwicklungsanomalien der Larven der F₂-Generation lassen sich nicht eindeutig auf eine endokrine Aktivität zurückführen. Dennoch erscheint eine Beeinflussung des Hormonmetabolismus, wie man sie von anderen Xenoestrogenen an Reptilien bereits kennt (Guillette und Crain, 1996), auch im Fall von Nonylphenol und dem später vorgestellten Octylphenol nicht unwahrscheinlich. Für Octylphenol konnte auch in einer anderen Studie mit ähnlichen Konzentrationen wie in der vorliegenden Untersuchung eine Schädigung der Nachkommen belasteter Eltern gezeigt werden (Gronen et al., 1999).

Als weiteren sehr deutlichen Effekt konnte bei den Nachkommen der mit $\geq 2 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol-belasteten Elterntiere aus dem Life-Cycle-Versuch eine Verzögerung bis hin zu einem völligen Ausbleiben des Schlupfes beobachtet werden. Über ähnliche Verzögerungen des Schlüpfens berichten Fent und Meier (1994) und Seim et al. (1984) nach Exposition von Elritzen- (*Phoxinus phoxinus*) und Regenbogenforelleneiern gegenüber Triphenylzinnchlorid bzw. Kupfer, sowie Dave und Xiu (1991) an Zebrabärblingen nach subletaler Gabe von Kupfer und Nickel. Grund für die Schlupfverzögerungen sind nach Dave und Xiu (1991) entweder eine direkte schadstoffbedingte Hemmung der Chorionase (von Westerhagen, 1988b) oder osmotische Störungen, die wiederum die Chorionase oder die muskuläre Befreiungsbewegung des Embryos beeinflussen können. Die Chorionase ist ein Enzym, das für die Auflösung der *Zona interna* des den Embryo umgebenden Chorions verantwortlich ist (Denucé, 1985). Als weiterer möglicher Faktor, der unter Einfluss von Schadstoffen das Schlüpfverhalten der Larven beeinträchtigen kann, kommt die Sauerstoffsituation des Embryos in Frage (Dave und Xiu, 1991). So kann eine erhöhte Sauerstoffzufuhr zu einer Verlangsamung des Schlüpfverhaltens der Larven führen, während die Verminderung der Sauerstoffzufuhr das Schlüpfen fördert. Görge und Nagel (1990) wiesen allerdings in einer Studie an Zebrabärblingenlarven eine Stimulation des Sauerstoffverbrauchs bei Embryonen und Larven nach Deltamethrinexposition zusammen mit einer gleichzeitigen Hemmung des Schlüpfens nach.

In der vorliegenden Studie kann die Verzögerung bzw. das Ausbleiben des Schlupfes somit einerseits auf eine schadstoffbedingte Hemmung des Schlupfenzymes oder auf einen veränderten Sauerstoffbedarf des Embryos zurückgeführt werden. Ob hinter der möglichen Hemmung der Chorionase ein toxischer oder ein hormoneller Mechanismus steht, ist allerdings nicht zu sagen.

An einigen der Nachkommen der gegenüber 2 und 20 µg/L exponierten Tiere fiel auch eine anfänglich verlangsamte Entwicklung, vor allem im Sinne einer schwächeren Pigmentierung im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Diese Beobachtungen lassen sich teilweise mit den Ergebnissen von Nash (1997) korrelieren, die nach Belastung adulter Zebrabärblinge mit 17β-Estradiol einen Entwicklungsstillstand bei den Embryonen der Folgegeneration zeigen konnten.

Der wohl bedrohlichste Faktor für den Fortbestand der Zebrabärblingspopulation ist die starke Verminderung der Anzahl männlicher Tiere im Verhältnis zu den Weibchen, die nach Belastung der F₁-Generation mit 20 µg/L und 100 µg/L Nonylphenol beobachtet werden konnte. In diesen Versuchsansätzen waren zu Versuchsende nur noch maximal 10 % männliche Tiere nachweisbar. Ähnliche Veränderungen der Geschlechterzusammensetzung sind bisher aus der Literatur vor allem nach exogener Gabe von Hormonen bekannt (Yamamoto, 1969; Schreck, 1974; Yamazaki, 1983; Hunter and Donaldson, 1983), wie sie normalerweise in der Aquakultur eingesetzt werden. Im Freiland konnte ein verändertes Geschlechterverhältnis von Lang et al. (1995) an Klieschen (*Limanda limanda*) aus der Nordsee beobachtet werden. So resultierte beispielsweise die orale Gabe von 17α-Ethinylestradiol (50 µg/g Körpergewicht) vom 6. bis zum 25. Tag (= sensitive Phase der Geschlechterdifferenzierung) bei Tilapia (*Tilapia mossambica*) in einer kompletten Feminisierung genetischer Männchen (Nakamura and Takahashi, 1973; Nakamura, 1975). Yamamoto (1958) war der erste, dem die Umkehr des Geschlechts von Medakas (*Oryzias latipes*) mit Steroidhormonen wie 17β-Estradiol gelang. Die wichtigsten Faktoren für die erfolgreiche Induktion der Geschlechterumkehr sind (1) Einsatzzeitpunkt der Behandlung, (2) Dauer der Behandlung und (3) Dosis und Art des verwendeten Steroids (Nakamura et al., 1998). Obwohl in der vorgestellten Studie die Fische über den gesamten Lebenszyklus mit Nonylphenol belastet wurden, konnte keine 100 %ige Geschlechterumkehr beobachtet werden. Dies mag in erster Linie an der 50- bis 10.000fach geringeren Potenz von Nonylphenol im Vergleich zu 17β-Estradiol (Naylor et al., 1992) gelegen haben. Nonylphenol bindet mit einer ca. 4×10^5 fach geringeren Affinität als 17β-Estradiol an den Estrogenrezeptor (Villeneuve et al., 1997; Miles-Richardson, 1999a).

Neben den erwähnten Parametern, die direkt den Fortbestand einer Population durch Einbrüche in der Reproduktionsfähigkeit oder eine veränderte Geschlechterzusammensetzung gefährden können, können auch weitere an den Zebrabärblingen nach Nonylphenol-Exposition beobachtete Anomalien langfristig zu einer Gefährdung der Population führen. Veränderungen des Gewichtes, wie sie nach Exposition gegenüber Nonylphenol (≥ 2 µg/L) und 100 ng/L 17β-Estradiol an den untersuchten Zebrabärblingen beobachtet werden konnten, können zumindest unter natürlichen Bedingungen Folgen für das Überleben der Fische haben (Elliott, 1990; Ashfield et al., 1998). Als Auslöser für die beschriebenen Gewichtsunterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren kommen neben anderen Faktoren auch endokrine Wirkmechanismen in Frage (Servos, 1999). Daten aus anderen Versuchen, in denen nach 17β-Estradiol-Behandlung an Regenbogenforellen (Johnstone et al., 1978), Lachsen (*Salmo salar*;

Åkerblom, et al., 2000) und Seebarschen (*Dicentrachus labrax*; Blazquez et al., *in press*), sowie nach Nonylphenol- und Octylphenol-Belastung an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*; Ashfield et al., 1998), nach Bisphenol A-Gabe an Medakas (*Oryzias latipes*; Yokota et al., 2000) und nach Diethylstilbestrol-Exposition an Zwergwelsen (*Ictalurus punctatus*; Bulkley, 1972) Gewichtsveränderungen nachweisbar waren, unterstreichen diese Hypothese. Da Steroide wie 17 β -Estradiol und Testosteron die Synthese und Sekretion von Wachstumshormonen beeinflussen können (Sumpter, 1992), könnte es durch das estrogenähnlich wirkende Nonylphenol (Jobling et al., 1996) auch zu einer Beeinflussung des Wachstums auf diesem Weg gekommen sein. Als Folge wären dann auch die bei den Zebrabärblingen beschriebenen Gewichtsveränderungen denkbar.

Auch die bei den Zebrabärblingen ab einer Belastung mit 2 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol zu beobachtenden Skelett-Veränderungen könnten über die indirekte Wirkung des Xenoestrogens auf die Wachstumshormone zustande gekommen sein, die neben zwei weiteren Hormonen für die Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase und damit die Skelettbildung bei Fischen verantwortlich sind (Balment und Henderson, 1987). Zwar werden Knochenanomalien hauptsächlich durch mangelhafte Ernährung oder Stoffwechselstörungen (Mayer et al., 1978; Bengtsson, 1979; Hinton, 1993) hervorgerufen, doch kennt man sie auch als Folge der endokrinen Wirkung von Xenobiotika (Davis, 1995). Neben einigen PCBs sind auch die Plastikweichmacher als Substanzen beschrieben, die zu skeletalen, vor allem vertebrealen, Anomalien führen können (Davis, 1995). Bei Fischen, deren Embryonal- und Larvalentwicklung außerhalb des Mutterleibes stattfindet, scheinen diese Stoffe besonders gut auf die während der frühen Entwicklung stattfindenden zellulären Prozesse wie den Knochenaufbau wirken zu können (Davis, 1995). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen diese Theorie. Nach einwöchiger Belastung mit 100 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol konnten immerhin bei 5 % der Larven und im Early-Life-Stage-Test bei 6 % der mit 200 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol behandelten Tiere Wirbelsäulenanomalien festgestellt werden. Eine 100 %ige Manifestierung des Effekts war bei den juvenilen gegenüber 100 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol exponierten Zebrabärblingen des Life-Cycle-Versuchs zu beobachten und konnte an den adulten Tieren belegt werden. Nach lebenslanger Belastung der Zebrabärblinge mit Nonylphenol waren nicht nur bei den Tieren der F₁-Generation Skelettanomalien festzustellen, auch die Embryonen und Larven der unbelasteten F₂-Generation zeigten nach einer Belastung der Elterntiere mit 20 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol mit bis zu 20 % starke Wirbelsäulenverkrümmungen. Dieser Effekt lässt sich wieder durch die Übermittlung der Entwicklungsinformation über den Dotter erklären (Bern und Nishioka, 1993), als Weg für die endokrin aktiven Stoffe, mit den frühen embryonalen Stadien der Organismen zu interagieren (Davis, 1995).

Zwar lassen sich einige Effekte, die während des Life-Cycle-Versuchs oder nach histologischer und anatomischer Aufarbeitung der Versuchstiere beobachtet werden konnten, zum Teil auch durch toxische Mechanismen erklären, doch weist das Gesamtbild des Versuches eher in Richtung einer endokrinen Beeinflussung der Tiere, vor allem der F₁-, aber auch der F₂-

Generation. Unterstützt wird diese Theorie durch die Befunde zur Ultrastruktur der Leber der Versuchstiere, die eher auf eine hormonelle Beeinflussung der Tiere hindeuten. Die Leber gilt als hochempfindliches Monitororgan sowohl in Hinblick auf die schädigende Wirkung von Chemikalien (Hacking et al., 1978; Hinton et al., 1978; Klaunig et al., 1979; Gingerich, 1982; Braunbeck et al., 1989; Braunbeck et al., 1990a, b; Braunbeck und Storch, 1990; Braunbeck und Völkl, 1991; Braunbeck und Segner, 1992; Braunbeck et al., 1992a, b; Hinton, 1993) als auch auf frühe Veränderungen des Reproduktionssystems (Braunbeck et al., 1989). Die Ultrastruktur der Leber ist somit maßgeblich durch das Geschlecht und die gonodale Aktivität geprägt, zumal sie auch als Syntheseort von Vitellogenin eng mit der Gametogenese verknüpft ist (Plack und Fraser, 1971; Yamamoto und Egami, 1974; Emmerson und Petersen, 1976; Peute et al., 1978, 1985; van Bohemen et al., 1981; Ng et al., 1984; Fukayama, 1985).

Vor allem die Ausprägung des rauhen endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates spiegeln die Vitellogenese wieder (Braunbeck et al., 1989). Die nach Exposition der Zebraquärlinge beobachtete Zunahme des rER, die Vergrößerung der Golgi-Felder verbunden mit einer vermehrten Bildung von Golgi-Vesikeln, und die ab einer Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol auftretende Fenestrierung des rER bei männlichen Tieren zeigt eine erhöhte Proteinsyntheseleistung (Ng, et al., 1984; Braunbeck et al., 1989) und deutet damit auf eine erhöhte Vitellogeninproduktion der Zellen hin (Braunbeck et al., 1989). Da die Produktion von Vitellogenin unter normalen Umständen durch 17β-Estradiol induziert wird (Gronen et al., 1999; Toomey et al., 1999), kann im Fall der vorliegenden Studie von einer estrogenähnlichen Wirkung von Nonylphenol in ähnlicher Weise wie für das später diskutierte Octylphenol ausgegangen werden.

