

### 3.3 Der Einfluss von Octylphenol auf den Zebrafisch (*Danio rerio*)

**Zusammenfassung:** In ähnlicher Weise wie in dem mit Nonylphenol durchgeführten Life-Cycle-Experiment sollte durch die Untersuchung verschiedener funktioneller und morphologischer Parameter der Einfluss von Octylphenol auf eine sich entwickelnde Zebrafischpopulation beschrieben werden. Erste, durch Octylphenol hervorgerufene Effekte, zeigten sich bereits während der ersten Lebenswoche durch das Auftreten teratogener Effekte wie Wirbelsäulenverkrümmungen, Ödeme und Augenanomalien, bei bis zu 6 % der untersuchten Larven. Nach Exposition der Versuchstiere im Durchflusssystem bis zum Erreichen der Geschlechtsreife traten Veränderungen der Reproduktionsfähigkeit, erkennbar am Rückgang der Eizahlen und zum Teil der Befruchtungsraten, vor allem nach Kombination belasteter Tiere mit Kontrolltieren, auf. Besonders deutliche Unterschiede waren in der Entwicklungsgeschwindigkeit der Nachkommen der belasteten Zebrafische der F<sub>1</sub>-Generation zu erkennen. Bereits nach Exposition der Eltern gegenüber 2 µg/L Octylphenol fiel die erhöhte Mortalität bei den Larven der F<sub>2</sub>-Generation auf. Die Weiterbelastung der Tiere der F<sub>2</sub>-Generation führte zu keiner signifikanten Erhöhung von Mortalität und Teratogenität außer bei den 17β-Estradiol-Kontrollen.

Die histologische Aufarbeitung bestätigte die durch Octylphenol hervorgerufene Beeinflussung der Reproduktionsorgane, die sich während der Reproduktionsversuche andeutete. Vor allem nach Belastung mit 20 µg/L Octylphenol konnten „unreife“ Hoden und Ovarien dargestellt werden. Als weiterer wesentlicher Effekt ist das Vorkommen von prävitellogenen Oocyten inmitten von normal organisiertem Hodengewebe zu nennen. Als pathologischer Effekt konnte in den Ovarien der Versuchstiere eine dosisabhängige Zunahme atretischer Follikel dokumentiert werden. Nach Untersuchung der Hepatocyten Octylphenol-belasteter Zebrafische waren neben der Zunahme der Golgi-Apparate und -Vesikel Veränderungen der Speicherstoffzusammensetzung der Zellen zu erkennen. In den Kernen einiger Leberzellen fielen weiterhin strukturelle Besonderheiten der Nucleoli auf. Unabhängig von den getesteten Reproduktionsparametern war der Einfluss von Octylphenol auch auf den Konditionsfaktor und die Anatomie der Versuchstiere dokumentierbar.

In ähnlicher Weise wie nach Exposition gegenüber Nonylphenol konnten nach lebenslanger Octylphenol-Behandlung Effekte auf verschiedenen Organisationsebenen dargestellt werden, die eine endokrine Beeinflussung vermuten lassen. Sogar auf dem Niveau der Population zeigten sich Veränderungen im Sinne einer Zunahme weiblicher Tiere im Verhältnis zu den Männchen.

### 3.3.1 Octylphenol – Xenoestrogen und/oder Toxin?

Octylphenol ist wie Nonylphenol ein Abbauprodukt der Alkylphenol-Polyethoxylate, die als Zusätze in Reinigern, Detergenzien, Farben, Pestiziden und bei der Gummiherstellung Verwendung finden (Toomey et al., 1999). Mit Hilfe von Biomarkeruntersuchungen, wie der Induktion der Vitellogeninsynthese in Fischhepatocyten (Jobling und Sumpter, 1993; Jobling et al., 1996; Sumpter und Jobling, 1995; Lech et al., 1996; Ren et al., 1996) konnte für Octylphenol als biologisch aktivstes Alkylphenol (Davis et al., 1993), eine dem Hormon  $17\beta$ -Estradiol ähnliche, wenn auch um das Tausendfache geringere Wirkungsweise nachgewiesen werden (White et al., 1994). Eine Beeinflussung des Reproduktionssystems von Fischen, wie man sie von  $17\beta$ -Estradiol bereits seit den 50iger Jahren kennt (Yamamoto, 1958), zeigte sich beispielsweise bereits nach 21tägiger Octylphenol-Exposition adulter Medakas (*Oryzias latipes*). Neben der Reduktion der Eizahl um ca. 50 % bei den weiblichen Medakas war in dieser Studie bei einigen Männchen die Anlage von Oocyten in den Hoden erkennbar (Gronen et al., 1999). Eine Verkleinerung der Testes durch Octylphenol ist für männliche Ratten beschrieben, einhergehend mit einer Verringerung des Testosterongehaltes im Blut sowie einer Unterdrückung der Spermiogenese (Blake and Bookfor, 1997). Diese Effekte sprechen deutlich für eine Beeinflussung des Hormonsystems, die wahrscheinlich indirekt über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse stattfindet. Hier kann die Substanz wie  $17\beta$ -Estradiol eine Unterdrückung der Gonadotropinsynthese durch eine negative Rückkopplung bedingen (Blake and Bookfor, 1997). Eine solche Hemmung findet zumindest bei weiblichen Säugetieren nur dann statt, wenn ein Überangebot von  $17\beta$ -Estradiol oder des entsprechend dem Hormon wirkenden Stoffes vorhanden ist (Blake and Bookfor, 1997). Das Fehlen von Gonadotropin kann sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren weitreichende Störungen der Geschlechtsorgane zur Folge haben (Kime, 1999).

In anderen Studien wurde aber auch eine direkte, toxische Wirkungsweise von Octylphenol beschrieben (Blake et al., 1997; McLeese et al., 1996; Nair-Menon et al., 1996) und an spermatogenen Zellen und Sertoli-Zellen aus der Ratte bewiesen. Nach Belastung der Zellen einerseits mit  $17\beta$ -Estradiol und andererseits mit 4-*tert*-Octylphenol zeigte sich hier nur eine Schädigung durch Octylphenol. Bei den mit dem natürlichen Hormon behandelten Zellen war keinerlei Veränderungen gegenüber den Kontrollzellen festzustellen (Raychoudhury et al., 1999).

Der nachstehend beschriebene Life-Cycle-Versuch sollte dazu beitragen, einerseits die xenoestrogene Wirkung unterschiedlicher Octylphenol-Konzentrationen auf eine Fischpopulation zu untersuchen, aber auch die eventuell toxische Wirkung durch ultrastrukturelle Untersuchungen der Leber zu bewerten. Durch den Vergleich der Ergebnisse aus Life-Cycle-Test, Reproduktionsversuchen, Early-Life-Stage-Untersuchung, Histologie und Ultrastruktur sollte ein besseres Bild über das Wirkspektrum von Octylphenol entstehen.

### 3.3.2 Life-Cycle-Test mit Octylphenol

Der nachfolgend beschriebene Life-Cycle-Versuch wurde nach dem in Kapitel 3.2, Abb. 3.2.1 dargestellten Schema durchgeführt. Die Aufzucht und Hälterung der Tiere erfolgte gemäß der in Kapitel 2 beschriebenen Methodik. Die während der einzelnen Lebensphasen erhobenen Versuchsparameter sind in der Abbildung aufgezeigt und die daraus resultierenden Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

Die Testkonzentrationen für den Life-Cycle-Versuch wurden entsprechend dem ersten Life-Cycle-Versuch mit Nonylphenol auf 2, 20 und 100 µg/L Octylphenol festgelegt. Während des Versuches wurde der Octylphenol-Gehalt in den Aquarien durch ein Wasseranalyselabor untersucht. Bei dieser Untersuchung konnte Octylphenol nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden, die weit unter den gewünschten Werten lagen. Auf Nachfrage musste vom Analyselabor jedoch eingeräumt werden, dass die Proben sehr lange vor der Analyse ungekühlt aufbewahrt worden waren. Da Ansatzweise und Konzentrationen in diesem Versuch jedoch weitgehend mit dem Nonylphenolversuch übereingestimmt haben, und es sich bei beiden Stoffen um eng verwandte Moleküle handelt (siehe Kapitel 2.2.1), wurde der Versuch weitergeführt und angenommen, dass Octylphenol in nahezu zugegebenen Konzentrationen in den Aquarien enthalten war.

#### ***3.3.2.1 Embryonal-, Larval und Juvenilphase (bis 15 d) unter statischer Belastung mit Octylphenol, 17β-Estradiol und DMSO.***

Entsprechend dem Life-Cycle-Versuch mit Nonylphenol wurden zu Beginn der Versuches zunächst 300 befruchtete und unbefruchtete Eier mit 2 µg/L, 20 µg/L und 100 µg/L Octylphenol, 100 ng/L 17β-Estradiol und 0,02 % DMSO belastet. Ein Teil der Eier blieb unbelastet (Tab. 3.3.1). Sofort nach dem Aufteilen in die Petrischalen wurde mit dem Aussortieren begonnen. Nach dem Entfernen der koagulierten Eier ein Tag nach Ablage konnten die verbleibenden befruchteten Eier auf jeweils zwei Schalen pro Konzentration aufgeteilt werden (Tab. 3.3.1).

Bereits ab einer Belastung mit 2 µg/L fielen Entwicklungsanomalien wie Augenschäden, Ödeme und Wirbelsäulenverkrümmungen auf.

In den ersten Lebenswochen war die Mortalitätsrate der Larven und Jungfische mit zum Teil bis zu 40 % sehr hoch. Da jedoch auch in den Kontrollansätzen eine deutlich erhöhte Letalität im Vergleich zu dem unter Kap. 3.2 beschriebenen Life-Cycle-Versuch mit Nonylphenol zu erkennen war und eine schadstoffbedingte Schädigung ausblieb, wurde der Versuch weitergeführt und ein Teil der überlebenden Tiere am 15. Tag nach Eiablage in das Durchflusssystem überführt.

*Tabelle 3.3.1: Embryonal-, Larval- und Juvenilentwicklung der Zebrabärblinge unter dem Einfluss von Octylphenol.*

	H <sub>2</sub> O	0,02 % DMSO	2 µg/L OP	20 µg/L OP	100 µg/L OP	100 ng/L E2
Eizahl (n)	175	131	152	170	145	120
Tag des Schlupfes (d)	3 d	3 d	3 d	3 d	3 d	4 d
Mortalität – 1. Lebenswoche (n)	10	8	12	20	6	18
Mortalität – 2. Lebenswoche (n)	20	30	55	47	48	34
Missgebildete Larven (n)	-	-	2	4	9	-
Umgesetzte Jungfische (Durchfluss; n)	60	74	70	67	70	65

### **3.3.2.2 Juvenil- und Adultphase (ab 16 d) unter kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol im Durchflusssystem**

Die Fische blieben bis zum Erreichen der Geschlechtsreife, 3 ½ Monate nach Beginn des Versuches unter kontinuierlicher Belastung. Während der Durchflussphase waren keine Veränderungen in Verhalten und Morphologie an den Octylphenol-exponierten Zebrabärblingen zu erkennen. Die Tiere wuchsen und entwickelten sich normal.

### **3.3.2.3 Mortalität der F<sub>1</sub>-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 aufgefressen werden. In Tabelle 3.3.2 ist die Mortalität der F<sub>1</sub>-Generation von der 3. bis zur 20. Lebenswoche dargestellt.

*Tabelle 3.3.2: Anzahl der während der Durchflussphase gestorbenen Zebrabärblinge.*

	H <sub>2</sub> O	0,02 % DMSO	2 µg/L OP	20 µg/L OP	100 µg/L OP	E2
Mortalität in der 3. bis 14. Lebenswoche	10	11	11	0	2	16

### **3.3.2.4 Tests zur Ermittlung der Reproduktionsfähigkeit der Octylphenol-belasteten Zebrabärblinge**

Zur Ermittlung von Eizahl und Befruchtungsrate wurden jeweils 8 Brutgruppen (bestehend aus 1 Weibchen und 2 Männchen) aus jedem Testansatz untersucht. An jedem Versuchstag wurden immer ein bis zwei Brutgruppen jedes Versuchsansatzes parallel in der unter Kap. 2, beschriebenen Zuchtanlage zusammengesetzt. Durch den Parallelansatz von jeweils 10 Brutgruppen sollte ein hohes Maß an Vergleichbarkeit der Daten sichergestellt werden. Die Bestimmung von Eizahl und Befruchtungsrate fand am folgenden Tag statt.

Beim Vergleich der Anzahl der erfolgreichen Brutversuche der Brutgruppen Octylphenol-belasteter Zebrabärblinge mit unbelasteten Tieren ergaben sich bis zu einer Belastung mit 20 µg/L Octylphenol keine Veränderungen (Abb. 3.3.1). Deutliche Einbrüche in der Häufigkeit der erfolgreichen Brutversuche waren erst nach Belastung mit 100 µg/L Octylphenol zu erkennen. Von 8 getesteten Brutgruppen legten nur noch 4 Eier.

Im Gegensatz zu den 17β-Estradiol-Kontrollen des Life-Cycle-Versuchs mit Nonylphenol waren die untersuchten mit 17β-Estradiol behandelten Fische dieses Versuches zu 100 % bei der Eiablage erfolgreich. Auch die Anzahl der abgelegten Eier unterschied sich nach lebenslanger Behandlung mit 17β-Estradiol nicht wesentlich von den Kontrolltieren. Signifikante Unterschiede ergaben sich erst bei der Betrachtung der Befruchtungsraten. Die Fische der 17β-Estradiol-Kontrollen konnten nur noch 17 % der produzierten Eier befruchten.

Tiere, die über ihr gesamtes Leben mit Octylphenol belastet worden waren, zeigten weder bei den Eizahlen noch bei der Befruchtungsrate signifikante Einschränkungen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.3.2). Allerdings war eine tendenzielle Verringerung von Eizahl und Befruchtungsrate bei den mit 2 und 20 µg/L Octylphenol belasteten Zebrabärblingen zu erkennen. Überraschend war, dass die gegenüber 100 µg/L Octylphenol exponierten Fische keine Veränderungen im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen erkennen ließen.

Zur Ermittlung der geschlechterabhängigen Schadstoffwirkung wurden Kombinationstests durchgeführt, in denen Octylphenol-belastete Männchen mit Kontrollweibchen bzw. belastete Weibchen mit Kontrollmännchen verpaart wurden (Abb. 3.3.3). In einer weiteren Versuchreihe folgten Kombinationen von Männchen und Weibchen, die beide mit unterschiedlichen Octylphenol-Konzentrationen belastet worden waren. Die Ergebnisse der Kombinationstests zeigten eine deutliche Beeinträchtigung der Reproduktionsfähigkeit vor allem bei den männlichen Fischen. Während die belasteten Weibchen mit den Kontrolltieren immer Befruchtungsraten > 50 % erreichten, lieferten die belasteten Männchen in allen Kombinationen sowohl mit unbelasteten als auch mit belasteten Weibchen anderer Testansätze immer nur unter 50 % befruchtete Eier. Dieser Effekt zeigte sich besonders deutlich in Kombinationen von mit 100 µg/L Octylphenol-behandelten Männchen (Abb. 3.3.3).

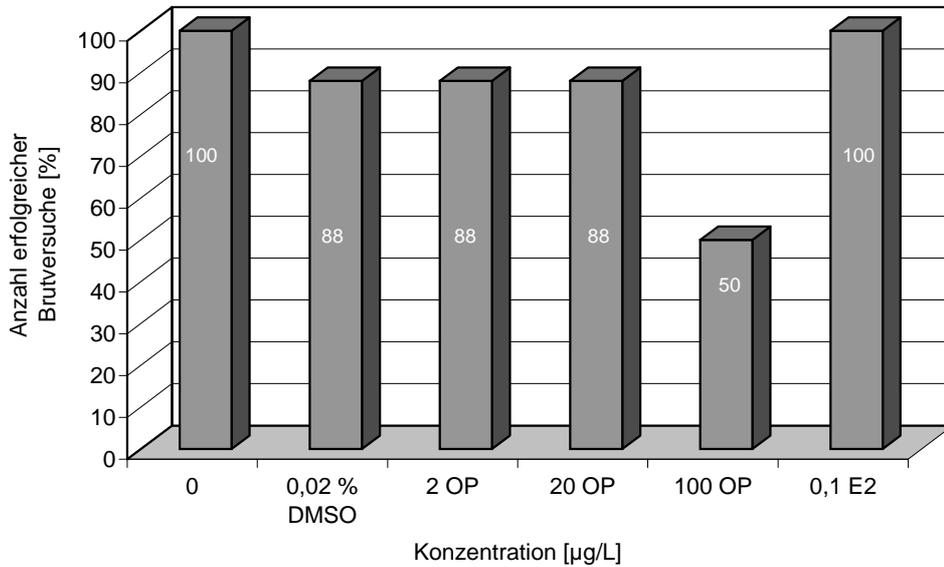


Abbildung 3.3.1: Anzahl der erfolgreichen Brutversuche der Zebraäbrblingsbrutpaare, die über ihr gesamtes Leben mit 0,02 % DMSO, 2, 20 und 100 µg/L Octylphenol sowie 100 ng/L 17β-Estradiol behandelt wurden (n=8).

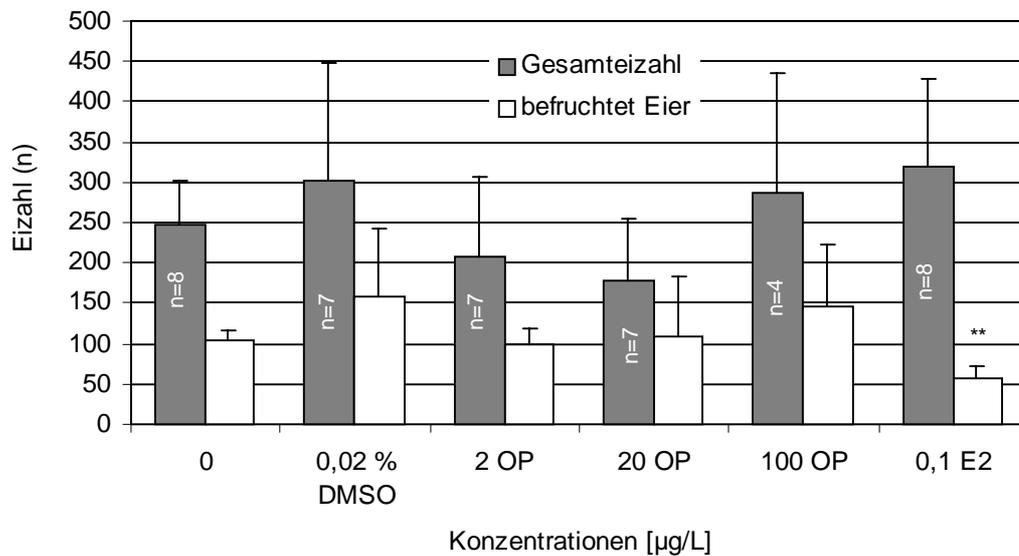
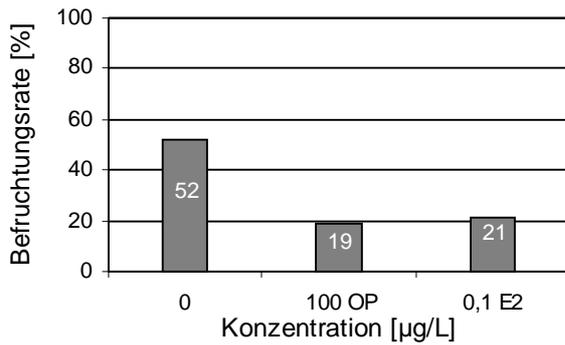
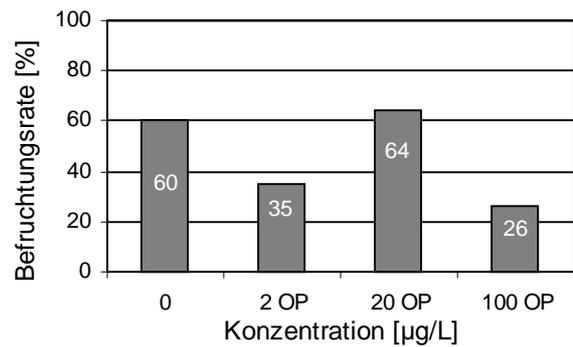


Abbildung 3.3.2: Gesamteizahl und Befruchtungsrate bei Zebraäbrblingen (*Danio rerio*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit 0,02 % DMSO, 2, 20 und 100 µg/L Octylphenol und 100 ng/L 17β-Estradiol (E2). n = Anzahl erfolgreich laichender Brutpaare aus insgesamt 8 angesetzten Paaren. Signifikanz der Unterschiede zu den Kontrollen nach Student's t-Test: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

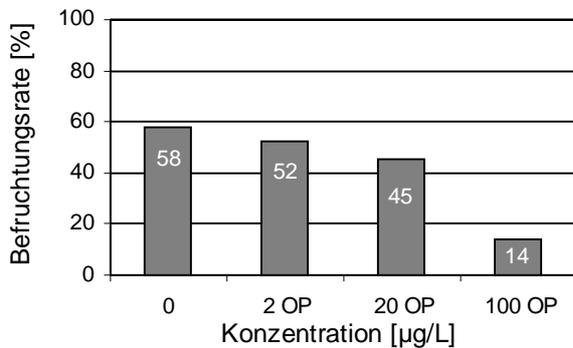
Verpaarte man die mit 100 µg/L belasteten Männchen beispielsweise mit mit 2 µg/L Octylphenol belasteten Weibchen, konnten sie nur 14 % der produzierten Eier befruchten. Auch mit Weibchen des Versuchsansatzes 20 µg/L Octylphenol erzielten die mit 100 µg/L Octylphenol behandelten Männchen mit 26 % nur eine weit unter den Kontrollen liegende Befruchtungsrate. Eine eher positive Beeinflussung war bei den weiblichen gegenüber 100 µg/L Octylphenol und 100 ng/L 17β-Estradiol exponierten Fischen zu erkennen. Hier lagen die Befruchtungsraten deutlich über dem Wert der Kontrollen.



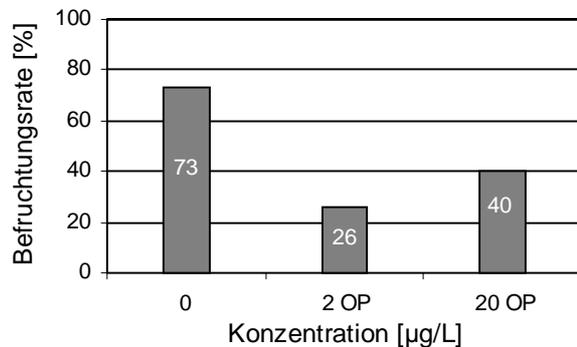
A. Weibchen unbelastet – Männchen siehe Abszisse



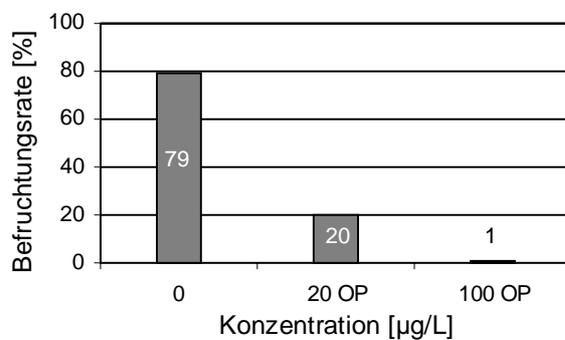
D. Weibchen: 20 µg/L Octylphenol - Männchen siehe Abszisse



B. Weibchen: 2 µg/L Octylphenol – Männchen siehe Abszisse



E. Weibchen: 100 µg/L – Männchen siehe Abszisse



C. Weibchen: 17β-Estradiol – Männchen siehe Abszisse

Abbildung 3.3.3: Prozentuale Darstellung der Ergebnisse der Kombinationstests. Die auf der Abszisse aufgetragenen Konzentrationen geben wieder, mit welcher Octylphenol- und 17β-Estradiol-Konzentration die getesteten Männchen belastet waren.

### 3.3.2.5 Anomalien in Schlupf und Entwicklung der F<sub>2</sub>-Generation

Jeweils 70 befruchtete Eier von Eltern aus jedem Ansatz des Life-Cycle-Versuchs wurden in Petrischalen mit reinem Wasser überführt. Weitere 70 Eier wurden ebenfalls in Petrischalen, mit den gleichen Schadstoffkonzentrationen weiter belastet wie zuvor die Elterntiere. Die Dokumentation der Entwicklung der Embryonen und Larven erfolgte über 8 Tage.

Bei der Untersuchung von Schlupfzeitpunkt, Mortalität und Teratogenität ergaben sich zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Embryonen und Larven, deren Eltern

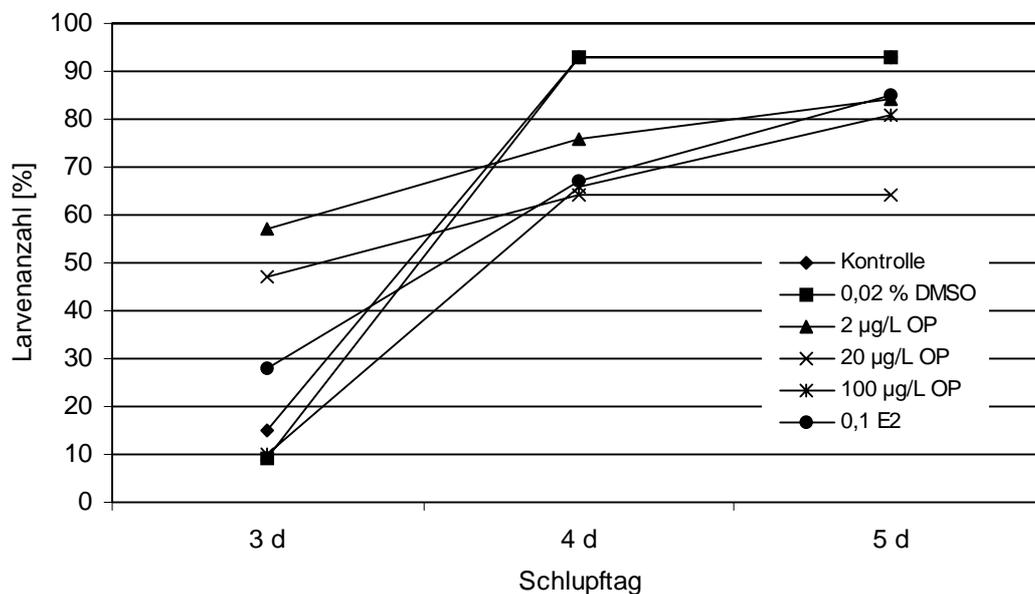


Abbildung 3.3.4: Anzahl der nach 3, 4, und 5 Tagen geschlüpften Larven der F<sub>2</sub>-Generation nach Belastung der Elterntiere mit 2, 20 und 100 µg/L Octylphenol, 0,02 % DMSO und 100 ng/L 17β-Estradiol. Eier und Larven wurden nach der Eiablage in reinem Wasser in Petrischalen bei 26°C gehalten.

unterschiedlichen Schadstoffkonzentrationen ausgesetzt worden waren (Abb. 3.3.4). Während beispielsweise am 3. Tag nach Eiablage (1. Tag = Tag der Eiablage) erst 9 % der Nachkommen der DMSO-Kontrolltiere geschlüpft waren, hatten bereits 47 – 57 % der Larven der mit 2 und 20 µg/L Octylphenol belasteten Eltern das Ei verlassen. Dennoch war der Schlupferfolg am 5. Tag bei den aus den beiden Negativkontrollen (DMSO und H<sub>2</sub>O) hervorgegangenen F<sub>2</sub>-Generationen mit 93 % deutlich höher als bei den Nachkommen Schadstoff- und Hormon-exponierter Tiere. Am schlechtesten war die Schlupfrate (63 %) bei Nachkommen von gegenüber 20 µg/L Octylphenol exponierten Eltern. Auch beim Vergleich der Mortalitäten konnte in diesem Ansatz eine Erhöhung um 6 % im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden, obwohl die Embryonen selbst unbelastet blieben (Abb. 3.3.5). Durch zusätzliche Belastung der Embryonen und Larven mit den gleichen Octylphenol-Konzentrationen, der auch

die Elterntiere im Life-Cycle-Experiment ausgesetzt waren, kam es zu einer Erhöhung der Mortalität um 7 %, während die Teratogenität mit 2 % auf dem Niveau der Kontrollen blieb. Eine erhöhte Mortalität und Teratogenität in der F<sub>2</sub>-Generation zeigte sich einerseits bei unbelasteten Larven von mit 2 µg/L Octylphenol belasteten Eltern, andererseits bei mit der gleichen Menge weiter belasteten Larven (Abb. 3.3.5). Die wohl größte Auffälligkeit dieses Versuches war die stark erhöhte Teratogenität der Tiere, deren Eltern über den gesamten Lebenszyklus dem Hormon 17β-Estradiol ausgesetzt waren. Die Teratogenitätsrate lag hier bei weiter belasteten Larven bei 30 % und bei unbelasteter F<sub>2</sub>-Generation bei 5 %.

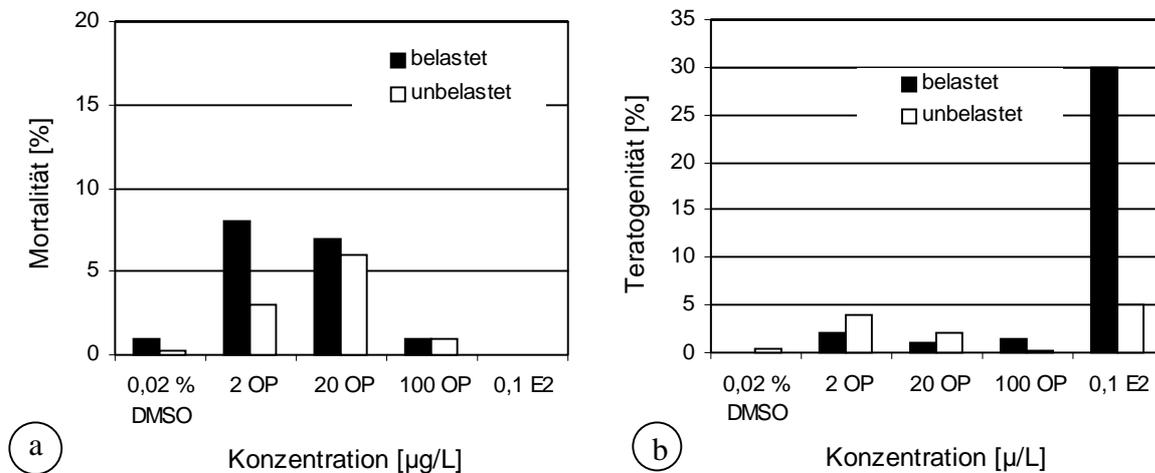


Abbildung 3.3.5: (a) Mortalität und (b) Teratogenität der F<sub>2</sub>-Generation in der ersten Lebenswoche. Verglichen wurden Tiere, deren Eltern mit den auf der Abszisse aufgetragenen Octylphenol-Mengen belastet worden waren. Ein Teil der Eier und Embryonen wurden mit den gleichen Dosen weiter belastet (schwarze Balken), während ein anderer Teil unbelastet blieb (weiße Balken).

Als teratogene Effekte traten in erster Linie Schädigungen der Wirbelsäule und die Bildung von Ödemen auf (Bildtafel 23). Während bei einem Teil der Larven ein deutlicher Knick im vorderen Bereich der Wirbelsäule dokumentiert werden konnte (Bild 23a, b), zeigten sich andere Larven vollständig gebogen (23a, c, d, e, f). Häufig war mit der vollständigen Verkrümmung die Bildung von Perikardial- und/oder Bauchödemen korreliert (Bild 23a, d, e, f). Ödeme traten aber auch ohne gleichzeitige Krümmung der Wirbelsäule auf (Bild 23h, i). Tiere, die Wirbelsäulenschädigungen erkennen ließen, waren nicht mehr zu einer gerichteten Lokomotion fähig und starben noch während der ersten Lebenswoche. Auch die Larven, die durch die Ödeme meist sehr stark geschädigt waren, starben wenige Tage nach dem Schlupf.

Bei nahezu allen Tieren, die eine starke Schädigung der Wirbelsäule aufwiesen und Ödeme trugen, waren zusätzlich Anomalien der Augenanlagen dokumentierbar. Oftmals waren die Augen nur sehr klein angelegt (Bild 23c, d) oder fehlten vollständig (Bild 23e).

Der Early-Life-Stage-Test in der F<sub>2</sub>-Generation paßt mit seinen Ergebnissen zu den bereits beschriebenen Tendenzen. Besonderes am Beispiel der 17 $\beta$ -Estradiol-Kontrolle wird deutlich, dass nicht allein die Reproduktionsfähigkeit im Sinne einer verminderten Eizahl und Befruchtungsrate durch die Hormoneinwirkung beeinträchtigt wurde. Vielmehr wurden auch die zunächst noch lebensfähigen Embryonen und Larven bereits innerhalb der ersten Lebenswoche durch Wirbelsäulenanomalien und Ödembildungen stark geschädigt. Wenn auch nicht so stark, ist dieser Trend auch nach Belastung mit verschiedenen Octylphenol-Mengen deutlich. Hier kam es zu einer erhöhten Beeinträchtigung der Folgegeneration, bedingt ausschließlich durch die Schadstoffweitergabe durch die Elterntiere, ohne dass die Eier und Larven zusätzlich weiter belastet wurden.

---

**Bildtafel 23:** Zebraäbrblingslarven (*Danio rerio*) der F<sub>2</sub>-Generation 4 Tage nach Eiablage. Die Eltern der dargestellten Larven waren über ihr gesamtes Leben mit 20  $\mu$ g/L Octylphenol behandelt worden. **a:** Gesunde, gestreckte neben stark verkrümmten Larven (Vergrößerung: 10  $\times$ ). **b:** Larve mit starkem Knick im vorderen Bereich der Wirbelsäule ( $\rightarrow$ ; Vergrößerung: 26  $\times$ ). **c - e:** Larven, die neben einer vollständigen Krümmung Bauchödeme tragen ( $\star$ ). Bei allen Larven sind die Augen unterentwickelt oder fehlen vollständig ( $\rightarrow$ ; Vergrößerungen: **c:** 26  $\times$ ; **d:** 16  $\times$ ; **e:** 16  $\times$ ). **f:** und **g:** Larven mit Perikardial- und Bauchödem ( $\star$  und  $\rightarrow$ ; Vergrößerung: 16  $\times$ ). **e:** Ödem, einhergehend mit stark veränderter Körperform (nach 96 h; Vergrößerung: 26  $\times$ ). **h:** und **i:** Zebraäbrblingslarven mit Bauchödem, ohne Verkrümmung der Wirbelsäule (Vergrößerung: 26  $\times$ ).

**Bildtafel 23: Embryotox.**

3.3.2.6 *Geschlechterverhältnis der F<sub>1</sub>-Generation im Alter von 5 Monaten*

5 Monate nach Versuchsbeginn waren alle Zebrabärblinge geschlechtsreif. Das Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Fischen war sowohl in den Kontrollansätzen (H<sub>2</sub>O und DMSO) als auch in den Testansätzen 2 µg/L und 100 µg/L Octylphenol mit einem Anteil der Weibchen von 51 % weitgehend ausgeglichen. Ein starker Anstieg der Anzahl weiblicher Tiere in Relation zu den Männchen war nach Exposition gegenüber 20 µg/L Octylphenol und 17β-Estradiol zu erkennen. Während nach Belastung mit 20 µg/L Octylphenol immerhin noch ein Drittel der Tiere Männchen waren - dies entsprach einer Anzahl von 21 Tieren - waren bedingt durch den lebenslangen Einfluss des Hormons nur noch 9 Fische (= 18 %) männlich (Abb. 3.3.6). Wie sich bei der später beschriebenen Histologie zeigte, waren in den Hoden der mit 20 µg/L Octylphenol belasteten Männchen vereinzelt Oocyten erster Ordnung zu finden, aber in solch geringer Anzahl, dass hier nicht von Hermaphroditen gesprochen werden konnte. Wahrscheinlich waren diese Tiere auch als Männchen voll funktionsfähig.

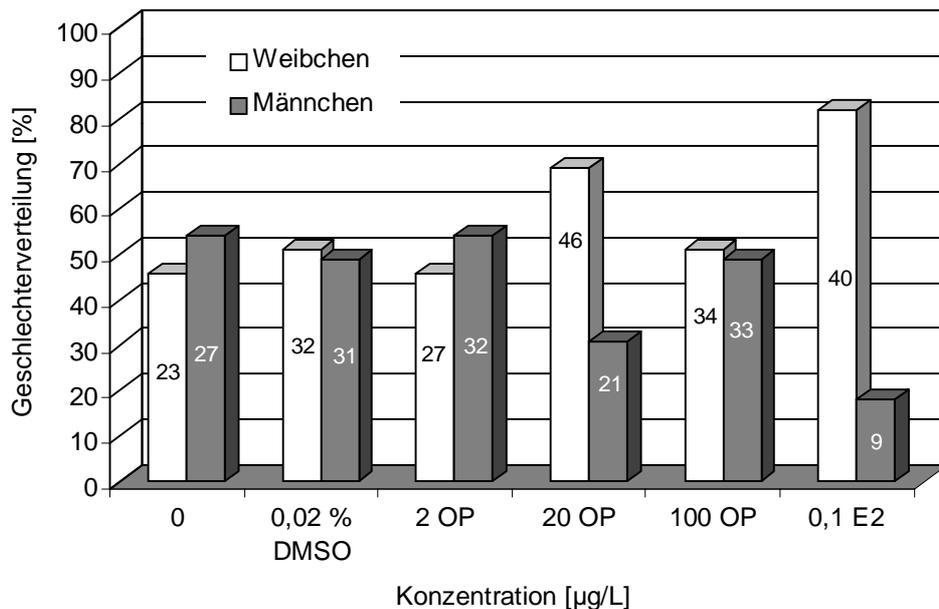


Abbildung 3.3.6: Geschlechterverteilung (in %), nach 5 monatiger Belastung der Zebrabärblinge mit 2, 20 und 100 µg/L Octylphenol (OP) sowie 100 ng/L 17β-Estradiol (Positivkontrolle) und 0,02 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Ein Teil der Tiere blieb unbelastet.

**3.3.2.7 Gewichts- und Längenverteilung der F<sub>1</sub>-Generation nach 5monatiger kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol**

Nach lebenslanger Exposition der Fische gegenüber Octylphenol waren nach Bestimmung von Gewicht und Größe bzw. dem berechneten resultierenden Konditionsfaktor zum Teil signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren zu beobachten. Die adulten, geschlechtsreifen Zebrabärlingsmännchen, die über den gesamten Lebenszyklus mit 2, 20 und 100 µg/L Octylphenol belastet waren, zeigten eine signifikante Erhöhung des Gewichtes im Vergleich zu den Negativkontrollen (Tab. 3.3.3). Eine signifikante Zunahme der Länge der männlichen Zebrabärblinge war jedoch nur bei den mit 100 µg/L Octylphenol belasteten Tieren zu erkennen. Dennoch blieb auch hier nach der Berechnung der Konditionsfaktoren die signifikante Gewichtserhöhung bestehen (Abb. 3.3.7). Es kann also als gesichert angesehen werden, dass Octylphenol, zumindest bei den männlichen Zebrabärblingen, ab 2 µg/L zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des Gewichtes unabhängig von der Länge, geführt hat.

Die gleiche Tendenz, jedoch erst ab 20 µg/L Octylphenol zeigte sich bei den Weibchen (Abb. 3.3.7). Wie bei den Männchen blieb auch hier die Länge weitgehend unbeeinflusst von Octylphenol.

*Tabelle 3.3.3: Gewicht und Länge der Zebrabärblinge der F<sub>1</sub>-Generation (Alter 3 Monate) nach Belastung während des gesamten Lebenszyklus mit Octylphenol, DMSO und 17β-Estradiol.*

	Gewicht [g]		Länge [cm]	
	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
Kontrolle	0,62 ± 0,19	0,43 ± 0,06	4,0 ± 0,29	3,7 ± 0,33
DMSO	0,57 ± 0,12	0,41 ± 0,05	4,0 ± 0,42	3,8 ± 0,39
2 µg/L Octylphenol	0,61 ± 0,13	0,49 ± 0,08 <sup>***</sup>	3,9 ± 0,30	3,8 ± 0,29
20 µg/L Octylphenol	0,64 ± 0,14	0,48 ± 0,07 <sup>***</sup>	3,7 ± 0,28 <sup>**</sup>	3,7 ± 0,20
100 µg/L Octylphenol	0,70 ± 0,13 <sup>***</sup>	0,50 ± 0,06 <sup>***</sup>	4,0 ± 0,23	4,0 ± 0,24 <sup>**</sup>
0,1 µg/L 17β-Estradiol	0,65 ± 0,13	0,48 ± 0,06	4,0 ± 0,28	3,9 ± 0,39

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

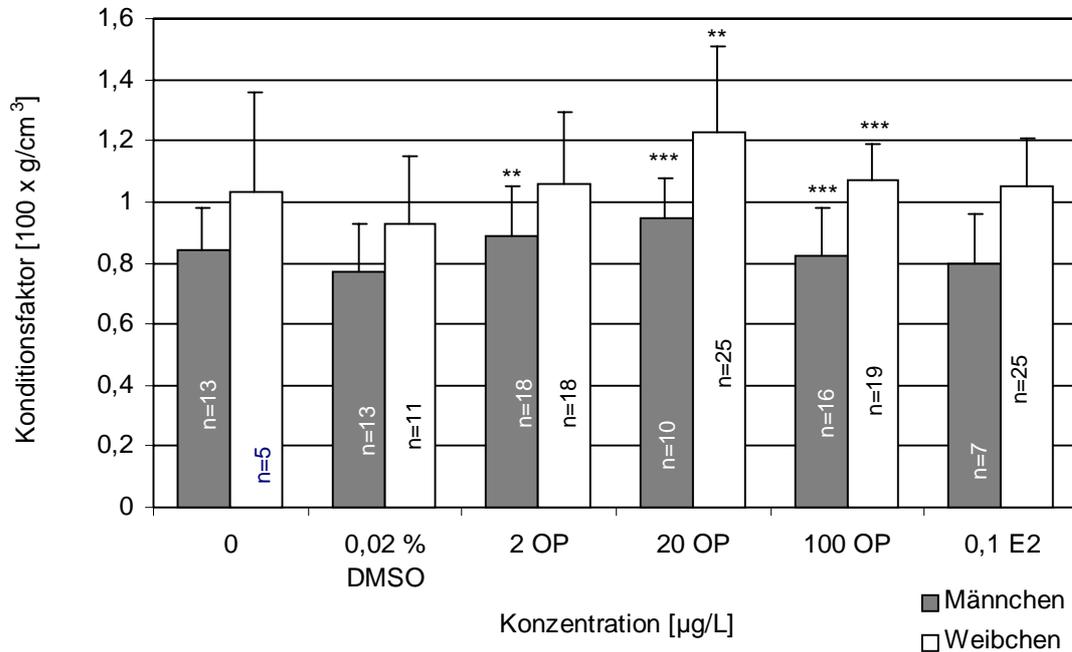


Abbildung 3.3.7: Konditionsfaktor aller entnommenen Versuchstiere nach Ende des Life-Cycle-Versuchs. Signifikante Veränderungen zu den Negativkontrollen (nach dem Student's t-Test) sind mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

### 3.3.2.8 Histologische Befunde der Gonaden der Zebrafärblinge der $F_1$ -Generation

#### Kontrolltiere

Zur Histologie der Kontrolltiere (DMSO und Wasser) siehe Kapitel 3.2.2.10.

#### Weibchen nach Belastung mit 2 µg/L Octylphenol

Bei den mit 2 µg/L Octylphenol belasteten Weibchen waren keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten.

#### Männchen nach Belastung mit 2 µg/L Octylphenol

Ähnlich wie bei den gegenüber Nonylphenol exponierten Zebrafärblingen zeigten sich nach Behandlung der Tiere mit 2 µg/L Octylphenol nur geringfügige Veränderungen im Vergleich

zu den Kontrollen. Auffällig waren lediglich die dicht mit Spermien angefüllten Tubuli seminiferi der Hoden der belasteten Tiere.

### *Weibchen nach Belastung mit 20 µg/L Octylphenol*

Die weiblichen Zebrabärblinge, die über ihr gesamtes Leben gegenüber 20 µg/L Octylphenol exponiert waren, unterschieden sich in ihrer Morphologie deutlich von den Kontrolltieren.

- Bei 80 % der Weibchen waren die Ovarien zwar ähnlich den Kontroll ovarien organisiert, doch war der Anteil an Oocyten der Reifestufe I deutlich erhöht. Atretische Eier, die bei den Kontrolltieren nur vereinzelt zu finden waren, traten hier in hoher Zahl auf (Bildtafel 24, Bild b – f). Vor allem atretische Follikel des Typs II waren zu beobachten, zur Definition siehe Kapitel 3.2.2.9, Tabelle 3.2.2.6.
- Bei 20 % der Tiere waren Ovarien dokumentierbar, die ausschließlich Oocyten der Reifestufen I enthielten und somit unreif waren (Bildtafel 24, Bild a). Diese Ovarien waren sehr klein und verliefen als schmales Band dorsal der Leber. Da die Tiere jedoch mit 5 Monaten gleich alt wie die anderen Zebrabärblinge des Life-Cycle-Versuchs waren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um einen schadstoffbedingten Effekt handelte. Die Fische waren sonst normal entwickelt und unterschieden sich in der Größe nicht von den anderen gegenüber 20 µg/L exponierten Tieren, waren aber deutlich leichter.
- Bei einem Tier war am Rand des normal entwickelten Ovars ein Samenleiter, angefüllt mit Spermien, erkennbar.

---

**Bildtafel 24:** Querschnitt durch das Ovar von mit 20 µg/L Octylphenol behandelten Zebrabärblingsweibchen. **a:** Unreifes Ovar, das ausschließlich Oocyten der Reifestufe I enthält. Das Ovar verläuft als schmales Band dorsal der Leber (Vergrößerung: 400 ×). **b:** und **c:** Atretische Follikel Typ II, mit deutlicher Hyperplasie der Thekazellen (→). Die Oocyte befindet sich im Stadium der Oolyse: **b:** erkennbar sind noch Dottertropfen (▶; Vergrößerung: 112 ×) bzw. **c:** eine grün färbende Gallerte (★; Vergrößerung: 146 ×). **d:** Atretischer Follikel Typ II. Die Degeneration des Follikels ist weiter fortgeschritten. Thekazellen (▶) besetzen das Follikellumen und dringen in die degenerierende Oocyte (★) ein. In die Thekaschicht treten Blutkapillare ein (→; Vergrößerung: 224 ×). **e:** Spätes Stadium des Corpus atreticum Typ II. Neben Dottertropfen (▶) sind die pyknotischen Kerne der Thekazellen zu erkennen (→; Vergrößerung: 704 ×). **f:** Normal entwickelter Follikel. Erkennbar sind Theka- und Granulosazellschicht und das Chorion (Vergrößerungen: 704 ×).

**Bildtafel 24:** *Beschreibung siehe Seite 123.*

Bildtafel 24: Ovar 20

### *Männchen nach Belastung mit 20 µg/L Octylphenol*

Die Hoden der männlichen gegenüber 20 µg/L Octylphenol exponierten Tiere hatten eine im Vergleich zu den Kontrolltieren stark veränderte Struktur. Während die Kontrollhoden langgestreckt entlang der Schwimmblase angeordnet waren, wirkten die Hoden der belasteten Tiere rund und stark komprimiert (Bildtafel 25). Auch die lockere Organisation der langgestreckten Tubuli der Kontrolltiere war nach Belastung nicht mehr zu erkennen (Bild 25a). Die Tubuli waren jetzt ebenso wie das Gesamtorgan rund und bei 80 % der Fische dicht mit Spermien angefüllt.

Innerhalb der Tubuluswände waren oft große Ansammlungen von Sertoli-Zellen (Bild 25e – 7) zu beobachten, die bei den Kontrolltieren nur sehr selten zu sehen waren. Gleich den Kontrollhoden zeigten sich Spermatogonien unterschiedlicher Reifestufen innerhalb der Tubuluswände (Bild 25a – e).

Bei 20 % der mit 20 µg/L belasteten Zebraäbrlingsmännchen waren innerhalb der Hoden vereinzelt Oocyten der Reifestufe I zu finden.

### *Weibchen nach Belastung mit 100 µg/L Octylphenol*

Die Ovarien der mit 100 µg/L Octylphenol belasteten Weibchen entsprachen in Form und Größe denen der Kontrolltiere. Auffällig war bei allen Tieren das Vorkommen ausgereifter Oocyten (Reifestufe IV; zur Darstellung dieser Oocyten siehe Bildtafel 14; Seite 76). Diese Eizellen konnten bei den Kontrolltieren nie beobachtet werden, weil sie normalerweise erst wenige Stunden vor der Eiablage entstehen (Selman et al., 1993). Einige dieser Oocyten ließen bereits Anzeichen beginnender Atresie erkennen. Relativ selten (ca. 10 pro Ovarienquerschnitt) waren Oocyten der Reifestufe II und III zu beobachten. Meist wirkten diese durch die umgebenden reifen Eizellen zusammengedrückt. In der Peripherie der Ovarien, hauptsächlich lateral, befanden sich immer große Ansammlungen von Oocyten der Reifestufe I.

### *Männchen nach Belastung mit 100 µg/L Octylphenol*

Die Hoden der mit 100 µg/L Octylphenol belasteten Männchen zeigten nahezu die gleichen Veränderungen wie die der mit 20 µg/L Octylphenol belasteten Tiere. Wieder waren zu 100 % Hoden zu beobachten, die nicht mehr die langgestreckte Form der Kontrollhoden aufwiesen. Die Tubuli seminiferi waren prall mit Spermien angefüllt, und die Tubuli wirkten im Durchmesser kleiner als bei den Kontrolltieren. Erstmals fiel eine starke Vergrößerung der Leber der untersuchten Zebraäbrlingsmännchen auf.

## **Bildtafel 25 Hoden 100 OP**

**Bildtafel 25:** Querschnitt durch den Hoden eines über den gesamten Lebenszyklus mit Octylphenol behandelten männlichen Zebrafärbings. 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 = Spermatide; 6 = Spermium; 7 = Sertoli-Zelle. **a:** und **b:** runde Hodentubuli, dicht mit Spermien angefüllt (Vergrößerung: **a** und **b:** 330 ×). **b:** Zu erkennen sind, deutlich voneinander abgetrennt, die die Spermatogenese durchlaufenden Zellpopulationen (Vergrößerungen: 524 ×).

*Leber weiblicher und männlicher Zebrabärblinge nach Behandlung mit 100 ng/L 17 $\beta$ -Estradiol*

Zur Histologie der Ovarien und Hoden der mit 17 $\beta$ -Estradiol behandelten Zebrabärblinge siehe Kapitel 3.3.2.10.

**3.3.2.9 Ultrastrukturelle Veränderungen der Leber nach Exposition gegenüber Octylphenol und 17 $\beta$ -Estradiol**

*Leber unbelasteter Zebrabärblinge*

Zur Ultrastruktur der Leber der Kontrolltiere siehe Kapitel 3.3.2.11 und Tabelle 3.3.4.

*Leber weiblicher Zebrabärblinge nach Belastung mit Octylphenol ( $\geq 2$   $\mu$ g/L)*

Bereits ab einer Belastung mit 2  $\mu$ g/L Octylphenol waren an den Hepatocyten der weiblichen Zebrabärblinge deutliche Veränderungen vor allem des Proteinsyntheseapparates zu erkennen (Bildtafel 26, Bild a; Tab. 3.3.4). Besonders auffällig war die erhöhte Anzahl der Golgi-Felder und die Vergrößerung und Dilatation der Golgi-Zisternen. Häufig waren große hell- bis dunkelgrau erscheinende Golgi-Vesikel sichtbar (Bild 26a; Bildtafel 29, Bild b, c). Auch die Golgi-Zisternen zeigten eine deutliche Abstufung in der Elektronendichte.

Nach Belastung mit 2  $\mu$ g/L Octylphenol war zunächst eine starke Fenestrierung des rauhen endoplasmatischen Retikulums und an einigen Stellen auch eine vollständige Fragmentierung der Zisternen zu erkennen (Bild 26a). Mit diesen Veränderungen war der Verlust der Stapelbildung korreliert. Eine nahezu vollständige Fragmentierung der rER-Zisternen konnte nach Belastung der Zebrabärblingsweibchen mit 20  $\mu$ g/L Octylphenol beobachtet werden (Bildtafel 27, Bild a, b). In enger Assoziation an die rER-Zisternen zeigten sich die zahlreich auftretenden Mitochondrien.

Bei der Betrachtung der Kerne fielen nach Exposition gegenüber 2  $\mu$ g/L Octylphenol „worm-like bodies“ auf (Bildtafel 26, Bild a). Auch Kernporen konnten bei diesen Tieren in erhöhter Zahl dokumentiert werden (Bild 26c). Nach Behandlung mit 20  $\mu$ g/L Octylphenol war eine Form des Nucleolus erkennbar, die als „zebra-like“ oder „honeycomb-like“ beschrieben ist (Bildtafel 27, Bild a). Hierbei stellte sich der Nucleolus in Form geldrollenförmig angelegter Stapel dar.

Bei der Zusammensetzung der Speicherstoffe war vor allem eine Zunahme der Lipidtropfen in den Hepatocyten zu beobachten (Tab. 3.3.4).

### *Leber männlicher Zebrabärblinge nach Belastung mit Octylphenol ( $\geq 2 \mu\text{g/L}$ )*

Bei 50 % der gegenüber  $2 \mu\text{g/L}$  Octylphenol belasteten Männchen war die auffälligste Veränderung der Hepatocyten die Zunahme von Lipidtropfen (Bildtafel 28, Bild a), während sie sonst im Aufbau den Leberzellen der Kontrolltiere entsprachen (Bildtafel 28, Bild b; Bildtafel 26, Bild b). Weiterhin waren, ähnlich wie bereits bei den Weibchen beschrieben, in der Kernmembran zahlreiche Kernporen zu beobachten.

Veränderungen des Proteinsyntheseapparates zeigten sich hingegen bei 50 % der mit  $2 \mu\text{g/L}$  Octylphenol belasteten Zebrabärblingsmännchen. Dokumentiert werden konnte eine Zunahme der rER-Menge und einer Fenestrierung der rER-Zisternen (Bildtafel 29, Bild a). An den Leberzellen der  $\geq 20 \mu\text{g/L}$  Octylphenol-behandelten Zebrabärblingsmännchen war zusätzlich zum Verlust der Stapelbildung eine starke Fragmentierung der rER-Zisternen zu beobachten. Ein Teil der rER-Zisternen ließ eine Dilatation erkennen (Bild 29b). Golgi-Felder traten in erhöhter Anzahl auf und zeigten meist eine rege Vesikelbildung. Die Vesikel enthielten oft Material unterschiedlicher Elektronendichte (Bild 29a).

Anders als bei den weiblichen Tieren zeigten die Nucleoli der belasteten Zebrabärblingsmännchen keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Wie bei den Octylphenol-behandelten Zebrabärblingsweibchen waren allerdings häufig Kernporen dokumentierbar.

Die Glykogenfelder der  $2 \mu\text{g/L}$  Octylphenol-belasteten Zebrabärblingsmännchen waren im Vergleich zu den Hepatocyten der Kontrollmännchen stark verkleinert (Bildtafel 29, Bild, b; Tab. 3.3.4).

### *Leber weiblicher und männlicher Zebrabärblinge nach Behandlung mit $100 \text{ ng/L}$ $17\beta$ -Estradiol*

Zur Ultrastruktur der Leber der mit  $17\beta$ -Estradiol behandelten Zebrabärblinge siehe Kapitel 3.3.2.11 und Tabelle 3.3.4.

**Bildtafel 26:** Hepatocyten von, mit 2 µg/L Octylphenol belasteten Zebrabärblingen: **a:** weibliches Tier. Die Form des Zellkerns ist im Vergleich zu den Hepatocyten der Kontrolltiere nicht verändert. Zwischen den Membranen des Nucleus sind „worm-like bodies“ zu erkennen (siehe auch Einschub). Das raue endoplasmatische Retikulum (rER) ist stark fenestriert und an einigen Stellen (in Kernnähe) auch fragmentiert. Zu erkennen sind zahlreiche ausgedehnte Golgi-Felder. Die Golgi-Zisternen sind deutlich dilatiert und von unterschiedlicher Elektronendichte. An den Golgi-Zisternen ist eine rege Vesikelbildung erkennbar. Auch diese enthalten unterschiedlich elektronendichtes Material. Zwischen den Zisternen des rER sind eine Vielzahl von Mitochondrien zu finden (Vergrößerung: 8000 ×; Einschub: 50000 ×). **b:** männliches Tier. Die Hepatocyten sind ähnlich denen der Kontrollmännchen organisiert. Im Kern ist der Nucleolus und Heterochromatin erkennbar. In der Zelle ist nur wenig rER zu finden, das zahlreiche Mitochondrien umgibt. Golgi-Felder kommen in geringer Zahl vor. In den Zellen sind ausgedehnte Glykogenfelder erkennbar. Auffällig ist das Vorkommen großer Lipidtropfen in den Glykogenfeldern (Vergrößerung: 6545 ×). **c:** Nucleus mit einer Vielzahl von Kernporen (▶; Vergrößerung: 8000 ×).

**Bildtafel 27:** Hepatocyten weiblicher Zebrabärblinge nach Belastung mit 20 µg/L Octylphenol **a:** Im Kern der Leberzellen sind deutliche Veränderungen des Nucleolus erkennbar, die als „zebra-like“ oder „honeycomb-like“ beschrieben sind. Das raue endoplasmatische Retikulum (rER) ist stark fenestriert und an einigen Stellen (in Kernnähe) auch fragmentiert. Die Golgi-Felder enthalten Zisternen unterschiedlicher Elektronendichte. An den Golgi-Zisternen sind zahlreiche Golgi-Vesikel erkennbar, die unterschiedlich elektronendichtes Material enthalten. Zwischen den Zisternen des rER sind eine Vielzahl von Mitochondrien zu finden (Vergrößerung: 11250 ×). **b:** An der dargestellten Hepatocyte sind die deutlichen Veränderungen des Proteinsyntheseapparates zu erkennen. Das rER ist stark fenestriert bis fragmentiert. Zahlreiche Golgi-Felder sind zu erkennen. Die Golgi-Felder sind vergrößert, Zisternen und Vesikel enthalten unterschiedlich elektronendichtes Material (Vergrößerung: 19200 ×).

**Bildtafel 28:** Hepatocyten von Octylphenol-belasteten Zebrabärblingen: **a:** eines männlichen Tieres, nach Belastung mit 2 µg/L Octylphenol. Im Glykogenfeld der sonst entsprechend den Kontrollen organisierten Hepatocyte sind zahlreiche Lipidtropfen eingelagert (Vergrößerung: 9800 ×). **b:** eines männlichen Tieres, nach Belastung mit 20 µg/L Octylphenol. Zu erkennen sind ausgedehnte Golgi-Felder an denen eine rege Vesikelbildung sichtbar ist (Vergrößerung: 20000 ×). **c:** eines weiblichen Tieres nach Belastung mit 20 µg/L Octylphenol. An den Golgi-Zisternen sind Vesikel zu erkennen, die unterschiedlich elektronendichtes Material enthalten (Vergrößerung: 46900 ×).

**Bildtafel 29:** Hepatocyten männlicher Zebrabärblinge: **a:** nach Belastung mit 2 µg/L Octylphenol. Im Kern ist der Nucleolus und Heterochromatin erkennbar. Das raue endoplasmatische Retikulum (rER) ist fenestriert. Zu erkennen sind zahlreiche ausgedehnte Golgi-Felder. Die Glykogenfelder sind im Vergleich zu den Kontrollhepatocyten verkleinert (Vergrößerung: 8850 ×). **b:** nach Belastung mit 20 µg/L Octylphenol. Das rER ist stark fenestriert bis fragmentiert. Ein Teil der rER-Zisternen ist weiterhin dilatiert. Die Glykogenfelder sind im Vergleich zu denen der Kontrolltiere klein und enthalten zum Teil Lipidtropfen – hier mit Leaflet (Vergrößerung: 18300 ×).

**Bildtafel 26 Weibchen und Männchen nach Belastung mit 2 OP**

**Bildtafel 26:** *Beschreibung siehe Seite 129.*

**Bildtafel 27 Weibchen 20 OP**

**Bildtafel 27:** *Beschreibung siehe Seite 129.*

**Bildtafel 28: Effekte OP**

**Bildtafel 28:** *Beschreibung siehe Seite 129.*

**Bildtafel 29: Männchen 2 und 20 OP**

**Bildtafel 29:** *Beschreibung siehe Seite 129.*

## Ergebnisse und Diskussion

*Tabelle 3.3.4:* Cytologische Veränderungen in der Leber adulter Zebrabärblinge nach lebenslanger Exposition gegenüber Octylphenol ( $\geq 20 \mu\text{g/L}$ ) und DMSO.

	Weibchen			Männchen		
	Kontrolle	OP	E2	Kontrolle	OP	E2
<b>Kern</b>						
Unregelmäßige Kernumrisse	-	++	-	-	+	+
„Worm-like-bodies“	-	++	-	-	-	-
„Zebbralike“ oder „honey-comb-like“ Nucleolus	-	++	-	-	-	-
<b>Kernporen</b>	+	+++	+	+	+++	+
<b>Mitochondrien</b>						
Menge	++	++++	+++	++	+++	++
Heterogenität	+	++++	++	+	+++	++++
Assoziation mit ER	++	++++	++	++	+++	++
<b>rER</b>						
Menge	+++	++++	++++	+	+++	++
Fenestrierung der rER-Zisternen	-	+++	+	-	++	++
Vesikulierung und/oder Fragmentierung	-	+	+	-	+++	+++
Verlust der Stapelbildung	-	+++	++	-	+++	++
Bildung konzentrischer Membranwirbel	-	++	++	-	++	+
Dilatation der Zisternen	-	+++	+	-	+	++
<b>Golgi-Felder</b>						
Z. T. sehr elektronendichte Zisternen	-	+++	+	-	-	-
Periphere Golgi-Vesikel	+	++	-	-	-	-
Menge	++	+++	++	-	++	+
Dilatation der Zisternen		++++	+	-	++	++
Bildung konzentrischer Membranwirbel	-	+	-	-	+	+
Erhöhte Vesikelbildung	+	+	+++	-	++	++
VLDL-Sekretion	-	++	-	-	-	-
<b>Reservestoffe</b>						
Lipidmenge	++	+	+++	+	++	+
Glykogenmenge	++	-	+	++++	++	++
Glykogenosomen	-	-	-	-	++	-

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

### 3.3.2.10 *Veränderungen des Skeletts und des Schädels nach Exposition gegenüber Octylphenol*

#### *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 Hämalbögen waren deutlich als langgestreckte, nach caudal gerichtete, Fortsätze sichtbar. Die Aufgabelung der Wirbelsäule im Bereich der Schwanzflosse war deutlich getrennt und somit auch die Flossenstrahlen der Schwanzflosse.

#### *Zebrabärblinge nach Belastung $\geq 20 \mu\text{g/L}$ Octylphenol*

Bei den Zebrabärblingen, die über ihr gesamtes Leben mit  $\geq 20 \mu\text{g/L}$  Octylphenol belastet wurden, konnten zum Teil starke Verkrümmungen der Wirbelsäule beobachtet werden, wahrscheinlich ausgelöst durch die Strukturveränderung der Wirbelkörper. Diese waren dünner als die der Kontrolltiere, und der Spalt zwischen den einzelnen Wirbelkörpern war nicht mehr erkennbar. Die Neural-, Hämalbögen und Rippen erschienen stark verbogen. Im Gegensatz zu den mit Nonylphenol belasteten Tieren waren keine Veränderungen im Bereich der Schwanzwirbelsäule zu beobachten. Die Aufgabelung der Wirbelsäule zur Schwanzflosse war wie bei den Kontrolltieren deutlich erkennbar.

---

**Bildtafel 30:** Skelette unbelasteter und mit unterschiedlichen Octylphenol-Konzentrationen behandelter 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. **b:** Skelett eines über das gesamte Leben mit  $20 \mu\text{g/L}$  Octylphenol behandelten Zebrabärblings. Die Wirbelkörper sind 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 ( $\blacktriangleright$ ). Die Aufgliederung der Wirbelsäule im Schwanzbereich ist erkennbar. **c:** Skelett eines Zebrabärblings der über das gesamte Leben mit  $100 \mu\text{g/L}$  Octylphenol behandelt wurde. Die Veränderungen der Wirbelsäule sind weniger auffällig als nach Belastung mit  $20 \mu\text{g/L}$ . Die Wirbelkörper sind deutlich dicker als bei den  $20 \mu\text{g/L}$  Octylphenol-belasteten Tieren und die Wirbelsäule ist weitgehend gerade ( $\rightarrow$ ). Vergrößerungen (a, b und c):  $3 \times$ .

**Bildtafel 30:** *Beschreibung siehe Seite 135.*

**Bildtafel 30: Skelette**

### 3.3.3 Untersuchung der Wirkung von Octylphenol im Early-Life-Stage-Test

Die folgende isolierte Early-Life-Stage-Untersuchung ist als eine Ergänzung zum bereits beschriebenen Life-Cycle-Versuch gedacht; daher wurden mit 2, 20 und 100 µg/L Octylphenol die gleichen Testkonzentrationen gewählt und als Ergänzung 200 µg/L Octylphenol getestet. Als Kontrollen dienten eine 0,02 %ige DMSO-Lösung und reines Wasser. Die gewählte Anzahl von 20 Eiern ermöglichte eine genaue Beobachtung jedes einzelnen Tieres und seiner Entwicklung. Auftretende Schädigungen wurden in Tabelle 3.3.5.

*Tabelle 3.3.5:* Ereignisse während der Early-Life-Stage-Untersuchung unter dem Einfluss von Octylphenol, Wasser und DMSO. Dargestellt sind neben der Schlupfrate am 3. Tag nach Eiablage auftretende teratogene Schädigungen.

	H <sub>2</sub> O	DMSO		Octylphenol		
		0,02 %	2 µg/L	20 µg/L	100 µg/L	200 µg/L
Schlupfrate am 3. Tag nach Eiablage (%)	57	22	42	14	37	18
Stark gekrümmte Wirbelsäule (%)	-	-	-	-	-	6
Ödembildung am Perikard (%)	-	-	-	-	-	6
Augenanomalien (%)	-	-	-	-	-	6
Lethalität (am 6. und 7. Tag nach Eiablage; %)	-	-	-	-	-	59
Aufrechtes Schwimmen nach:	5 d	5 d	5 d	5 d	6 d	6 d

Nach einwöchiger Belastung von Zebraquariembryonen und -Larven mit unterschiedlichen Octylphenol-Konzentrationen im Early-Life-Stage-Test waren keine schwerwiegenden Beeinträchtigungen der Tiere bis zu einer Konzentration von 100 µg/L Octylphenol zu beobachten. Geringfügige Veränderungen im Vergleich zu den unbelasteten Fischen zeigten sich lediglich im um einen Tag verspäteten Schlupf vor allem der gegenüber 20 µg/L exponierten Embryonen sowie in einem geringfügig verzögertem Aufschwimmzeitpunkt ab der Belastung mit 100 µg/L Octylphenol.

Deutliche Effekte waren nach Exposition der Tiere gegenüber 200 µg/L Octylphenol zu erkennen. Neben Schädigungen der Wirbelsäule und Augenanomalien bei 6 % der Tiere war eine stark erhöhte Letalität 6 – 7 Tage nach Eiablage zu beobachten.

### 3.3.4 Diskussion der Wirkung von Octylphenol auf Zebrabärblinge

Entsprechend dem bereits diskutierten Life-Cycle-Versuch mit Nonylphenol zeigten sich auch nach Exposition von Zebrabärblingen gegenüber Octylphenol ab Ei bis zur Geschlechtsreife eindeutige Veränderungen zu den Kontrolltieren. Vor allem bei der Betrachtung der histologischen Effekte waren zumindest bei einem Teil der männlichen Zebrabärblinge starke Korrelationen zu dem mit Nonylphenol durchgeführten Life-Cycle-Experiment zu erkennen. Wenig überraschend ist es daher, dass auch die Daten aus den Reproduktionsexperimenten auf eine vermutlich hormonelle Beeinträchtigung durch Octylphenol hindeuten, wie sie in ähnlicher Weise für Nonylphenol bereits beschrieben werden konnte. Auf eine erhöhte Proteinsynthese, möglicherweise durch eine Octylphenol-bedingte Induktion der Vitellogenese, lassen die ultrastrukturellen Veränderungen der Hepatocyten schließen. An den gegenüber Octylphenol exponierten Zebrabärblingen waren die meisten Effekte jedoch bereits früher als an den Nonylphenol-belasteten Tieren dokumentierbar. Dies ist nicht erstaunlich, da Octylphenol in zahlreichen Studien als das stärkere Xenoestrogen bei nahezu gleicher Toxizität beschrieben werden konnte (White et al., 1994; Jobling et al., 1996; Servos, 1999).

In der Umwelt sind die Konzentrationen von Octylphenol normalerweise mit  $< 1\mu\text{g/L}$  (z. B. in britischen Flüssen) und in besonders belasteten Gebieten mit  $13\mu\text{g/L}$  (z. B. in einem britischen Estuar) weit geringer als die von Nonylphenol (Blackburn und Waldock, 1995). Dennoch lassen sich die in der vorliegenden Studie getesteten Konzentrationen zumindest teilweise mit den im Freiland gemessenen Werten vergleichen.

Effekte zeigten sich bereits ab einer Belastung mit  $2\mu\text{g/L}$  Octylphenol vor allem auf ultrastrukturellem Niveau, aber auch nach histologischer Aufarbeitung der Versuchstiere. Da jedoch bei den Kontrolltieren ein sehr starker Geschlechterdimorphismus der Hepatocyten zu erkennen war, wie ihn auch Peute et al. (1978 und 1985) und Braunbeck et al. (1989) beschreiben, müssen die ultrastrukturellen Veränderungen in beiden Geschlechtern getrennt bewertet werden. Nur so und mit dem Wissen, wie die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Zebrabärblingshepatocyten zustande kommen können, ist es möglich, die durch Octylphenol ausgelösten Effekte richtig einzugliedern.

Besonders deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern zeigten sich im Glykogen- und Lipidgehalt der Zellen. Hepatocyten männlicher unbelasteter Zebrabärblinge enthielten ähnlich wie die unreifer Weibchen (Peute et al., 1995) meist ausgedehnte Glykogenfelder und nur wenig Lipid, während die Leberzellen der geschlechtsreifen Weibchen wenig Glykogen und eine höhere Anzahl Lipidtropfen erkennen ließen. Diese Beobachtungen korrelieren mit Befunden an Zebrabärblingen (Peute et al., 1995) und anderen Teleostern, wie der Renke (*Coregonus nasus*; Valtonen, 1974) und dem Saibling (*Salvelinus fontinalis*; Whiting und Wiggs, 1978). Ausgelöst werden die Unterschiede in der Glykogenmenge der Hepatocyten männlicher und weiblicher Fische wahrscheinlich durch den Einfluss von  $17\beta$ -Estradiol

(Valtonen, 1974). Das Hormon, das bei geschlechtsreifen vitellogenen Weibchen im Blut zirkuliert, bewirkt über die Hemmung des Kohlenhydratmetabolismus eine Verminderung des Glykogengehaltes der Leber (Valtonen, 1974).

Nach Octylphenol-Exposition (2 µg/L) war in den Hepatocyten der männlichen Zebrabärblinge eine Verkleinerung der Glykogenfelder im Vergleich zu den Kontrollmännchen erkennbar. Weiterhin traten vermehrt Lipidtropfen in den Leberzellen auf. Ausgehend von der Begründung für den normalen Geschlechterdimorphismus der Zebrabärblingshepatocyten (Peute et al., 1995) könnten diese Effekte auf eine estrogene Wirkung von Octylphenol hindeuten. Es ist also anzunehmen, dass Octylphenol in ähnlicher Weise, wie das natürliche Estrogen bei den Weibchen, eine Reduktion des Glykogengehaltes bewirkt hat. Begründen lässt sich diese Hypothese auch durch eine Reihe von Studien, in denen nach 17β-Estradiol-Gabe in den Hepatocyten männlicher Fische ebenfalls Veränderungen in der Lipid- und Glykogenzusammensetzung beobachtet werden konnten. So beschreiben beispielsweise Olivereau und Olivereau (1979) bei männlichen Zebrabärblingen sowie Peute et al. (1985) bei männlichen Aalen (*Anguilla anguilla*) eine Abnahme des Glykogengehaltes verbunden mit einer Zunahme des Lipidgehaltes der Leberzellen nach 17β-Estradiol-Belastung. Eine Abnahme des Glykogengehaltes infolge der Wirkung von 17β-Estradiol ist auch in einer Studie von Khanna und Singh (1983) an weiblichen Prachtbarben (*Barbus conchoni*) gezeigt. Eine Zunahme des Lipidgehaltes wiesen schließlich auch Dasmahapatra und Medda (1982) in Hepatocyten männlicher Welse (*Heteropneustes fossilis*) nach Injektion von Estradiol-Dipropionat nach.

Aber nicht allein in der Zusammensetzung der Speicherstoffe unterschieden sich die Hepatocyten männlicher und weiblicher unbelasteter Zebrabärblinge. Unterschiede waren vor allem auch in der Ausprägung des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) und der Golgi-Felder zu erkennen. Während die Hepatocyten weiblicher Zebrabärblinge dicht mit rER-Stapeln angefüllt waren und meist zwei bis drei Golgi-Felder dokumentiert werden konnten, enthielten die Leberzellen der männlichen Fische nur wenig rER und Golgi-Felder. Die starke Ausprägung des Proteinsyntheseapparates (= rER und Golgi) der Hepatocyten lässt sich durch die Vitellogenin-induzierende Wirkung des, bei geschlechtsreifen Weibchen im Blut zirkulierenden 17β-Estradiol auf die Leber erklären (Peute et al., 1978; 1985; Braunbeck et al., 1989). Vitellogenin wird als Antwort auf 17β-Estradiol im rauen endoplasmatischen Retikulum der Hepatocyten synthetisiert und anschließend im Golgi-Apparat modifiziert (Hahn, 1967; Lewis et al., 1976; Carinci et al., 1979; van Bohemen et al., 1981; Bieberstein et al., 1999). Immunhistochemische und teilweise immuncytochemische Untersuchungen an Regenbogen- und Bachforellen unterstützen diese Hypothese (Wahli et al., 1998; Bieberstein et al., 1999).

Vor dem Hintergrund der estrogenbedingten Ausprägung von rER und Golgi-Apparat lassen sich die an den Zebrabärblingsweibchen und 50 % der Zebrabärblingsmännchen beobachteten Veränderungen nach Belastung mit 2 µg/L Octylphenol erklären. Die Hepatocyten dieser Tiere zeigten, neben einer Proliferation des rER, eine deutliche Vergrößerung der Golgi-

Felder und eine Zunahme der Golgi-Vesikelbildung. Da beide Effekte für eine Erhöhung der Proteinsyntheseaktivität der Zellen sprechen (Ng et al., 1984), die wahrscheinlich durch eine Erhöhung der Vitellogeninproduktion bei den Weibchen bzw. eine Induktion der Vitellogenese in der Leber der männlichen Versuchstiere (Braunbeck et al., 1989) ausgelöst wurde, ist eine estrogenische Wirkung von Octylphenol anzunehmen. Hierfür spricht auch die für Octylphenol beschriebene estrogenische Wirkungsweise (Gronen et al., 1999; Toomey et al., 1999) über eine Estrogenrezeptor-vermittelte Reaktion (White et al., 1994; Blake und Boockfor, 1997). Estrogenrezeptoren sind im Kern der Leberzellen von Fischen in hohen Mengen nachweisbar (Pottinger, 1986; Campbell et al., 1994; Sumpter und Jobling, 1995). Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Induktion der Vitellogeninsynthese nach Belastung männlicher Zebra- bärblinge liefert eine Studie von Aida et al. (1973). Hierin konnte nach  $17\beta$ -Estradiol-Behandlung männlicher Ayus *Plecoglossus altivelis* (Salmoniformes) neben einer Proliferation des rauen endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats die Erscheinung eines „weibchenspezifischen Plasmaproteins“ nachgewiesen werden.

Vor dem Hintergrund, dass es sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Zebra- bärblingen durch Octylphenol wahrscheinlich zu einer vermehrten Vitellogenin-Induktion und damit zu einer erhöhten Proteinsyntheseleistung der Hepatocyten gekommen ist, lässt sich auch die dosisabhängige Zunahme der Fenestrierung der rER nach Octylphenolbelastung vor allem bei den weiblichen Zebra bärblingen erklären. Eine Fenestrierung führt zu einer Vergrößerung der aktiven Membranfläche (Braunbeck et al., 1989) und bietet damit der Zelle die Möglichkeit, die Proteinsyntheseaktivität zu erhöhen.

Als weiterer Hinweis für die durch Octylphenol ausgelöste ansteigende Proteinsynthese- aktivität der Zellen ist die erhöhte Anzahl der Kernporen in den Hepatocytenuklei der weib- lichen und zum Teil der männlichen Zebra bärblinge nach Belastung mit  $2\ \mu\text{g/L}$  Octylphenol zu werten (Peute et al., 1978). Die Zunahme der Kernporen ist nach Lambert und van Oordt (1974) mit einer erhöhten Aktivität der  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität in den postovulatorischen Follikeln korreliert. Dieses Enzym nimmt eine Schlüsselposition bei der Synthese von  $17\beta$ -Estradiol ein (Peute et al., 1978), die bei vielen Teleostern, auch dem Ze- brabärbling, in den Ovarien ablaufen kann (s. Review bei Lambert und van Oordt, 1974).  $17\beta$ -Estradiol induziert die Vitellogeninsynthese in der Leber oviparer Vertebraten (Tata, 1976; Christiansen et al., 1998a; Kinnberg et al., 2000) wie dem Atlantischen Kabeljau (*Ga- dus morhua*; Plack und Fraser, 1971), der Flunder (*Platichthys flesus*; Emmerson, 1976; Em- merson und Peterson, 1976), der Scholle (*Pseudopleuronectes americanus*; Campbell und Idler, 1976), dem braunen Zackenbarsch (*Epinephelus akaara*; Tam et al., 1983) und dem Steifenbrassen (*Morone saxatilis*; Kishida et al., 1992). In der Leber des Krallenfrosches (*Xe- nopus laevis*) bewirkt  $17\beta$ -Estradiol einer Erhöhung des rRNA-Flusses verbunden mit einer hohen Proteinsynthese (Wittliff und Kenney, 1972a, b; Clemens und Tata, 1973; Clemens, 1974; Tata und Baker, 1975). Diese Erhöhung der rRNA-Flusses konnte von Scheer (1972) mit einer erhöhten Kernporenanzahl korreliert werden. Im Falle der in der vorliegenden Dis-

sertation untersuchten Zebrabärblingweibchen kann die erhöhte Anzahl von Kernporen auf eine erhöhte Vitellogeninsynthesaktivität zurückgeführt werden (Peute et al., 1978). Die bei den Männchen dokumentierte Erhöhung der Kernporen-Anzahl kann somit ebenfalls als Hinweis auf die beginnende Vitellogeninsynthese gewertet werden.

Die Vitellogeninsynthese-induzierende Wirkung von Octylphenol konnte bereits in zahlreichen Studien beschrieben werden, denen einerseits der Nachweis von Vitellogenin im Plasma belasteter Tiere (Jobling et al., 1996; Gronen et al., 1999) und andererseits die Bestimmung der Expression des Vitellogenin-Gens in Hepatocyten *in vitro* zugrunde lag (White et al., 1994). In vergleichenden Studien konnte eine für Octylphenol deutlich höhere Potenz als für Nonylphenol gezeigt (White et al., 1994; Jobling et al., 1996) und die Wirkkonzentration von Octylphenol für die Induktion der Vitellogeninsynthese auf ca. 3 µg/L bestimmt werden (Nonylphenol, ca. 10 µg/L; Servos, 1999). Die höhere estrogene Potenz im Vergleich zu Nonylphenol könnte ein Grund dafür sein, dass an den Hepatocyten der Zebrabärblinge bereits nach Exposition gegenüber 2 µg/L Octylphenol Effekte zu beobachten waren, die sich bei den Zebrabärblingen des ersten Life-Cycle-Versuchs erst nach Belastung mit 100 µg/L Nonylphenol zeigten.

Auch nach der histologischen Untersuchung zeigten sich nach Behandlung mit 20 µg/L Octylphenol deutlichere Effekte als nach Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol. Die Hoden der belasteten Männchen wiesen ähnliche strukturelle Veränderungen auf, wie sie bereits nach Nonylphenol-Exposition vorgestellt und im Hinblick auf eine mögliche Störung der Gonadotropinsynthese diskutiert wurden. Zusätzlich konnte allerdings das Auftreten prävitellogener Oocyten in normal entwickelten Hoden von 20 % der gegenüber 20 µg/L Octylphenol exponierten Zebrabärblingmännchen beobachtet werden. Dieser Effekt ist in der Literatur vor allem nach Hormonbehandlung gonochoristischer Fischarten beschrieben (Blázquez et al., 1998), zu denen auch der Zebrabärbling zählt (Takahashi, 1977). Das Vorkommen von Oocyten inmitten reifender Spermatozoen konnte aber auch nach Freilanduntersuchungen beispielsweise in Hoden adulter Karpfen (Goodbred et al., 1997) und nach Octylphenol-Exposition von Medakas (Gronen et al., 1999) gezeigt werden. Eine mögliche Ursache hierfür sehen viele Autoren in einer direkten Wirkung der Geschlechtssteroiden oder der ähnlich wirkenden Xenoestrogenen auf die Gonaden (Hunter und Donaldson, 1983; Nakamura et al., 1989; Blázquez et al., 1998). Durch die Veränderung des Hormonmilieus kann es zu einer Aktivierung von Spermatogonien kommen, die während der frühen Entwicklungsphasen noch bipotent sind. Eine Aktivierung dieser bipotenten Spermatogonien kann dann, wie in der Studie von Shibata und Hamaguchi (1988) nach exogener 17β-Estradiol-Gabe an Medakas (*Oryzias latipes*) beschrieben, das Entstehen von einzelnen Oocyten in den Hoden bedingen (Shibata und Hamaguchi, 1988). Im Falle des Zebrabärblings muss bedacht werden, dass sowohl die Männchen als auch die Weibchen vor der endgültigen sexuellen Differenzierung zunächst ein nicht funktionelles „Weibchenstadium“, gefolgt von einer intersexuellen Phase, durchlaufen (Takahashi, 1977; Chan und Yeung, 1983). Während des Weibchenstadiums

werden bei allen Tieren Ovarien, mit sich entwickelnden, aber prävitellogen bleibenden Oocyten angelegt. Bei der Umwandlung von Ovarien in Testes verschwinden dieser Oocyten unter normalen Umständen früher oder später (Takahashi, 1977). Dass es sich bei den gezeigten Effekten nicht um eine natürliche Verzögerung dieses Abbauprozesses handeln kann, wird beim Vergleich mit den Kontrollmännchen deutlich, bei denen nie Oocyten in den Hoden nachgewiesen werden konnten. Ausgelöst durch den Einfluss von Octylphenol kann es also entweder zu einer Verzögerung oder Blockade des Oocytenabbaus oder wie im Falle der Medakas zu einer Neuinduktion der Oocytenbildung in den reifenden Hoden gekommen sein. Ob dieser Effekt wirklich auf eine direkte Wirkung von Octylphenol auf die Gonaden zurückgeführt werden kann, ist nicht klar. Mousa und Mousa (1999) jedenfalls machen sowohl für das Auftreten von Eizellen in den Testes von Buntbarschen (*Oreochromis niloticus*) als auch für die Verringerung der Spermienmenge und das Erscheinen atretischer Follikel in den Ovarien der Weibchen eine verminderte Gonadotropinausschüttung verantwortlich.

Für eine Beeinflussung der Gonadotropinsynthese spricht auch das vermehrte Auftreten atretischer Follikel in den Ovarien der mit 20 µg/L Octylphenol belasteten Zebrabärblingsweibchen. Eine erhöhte Atresierate nach Octylphenol-Belastung ist auch von Gray und Metcalfe (1999) an Medakas ab einer Belastung mit 100 µg/L Octylphenol beschrieben und konnte auch nach Exposition gegenüber anderen (Xeno)Estrogenen in weiteren Studien dargestellt werden (McCormick et al., 1989; Sukumar und Karpagaganapathy, 1992; Goodbred et al., 1997; Olsson et al., 1999). Von den meisten Autoren wird dieser Effekt auf einen verminderten Spiegel im Blut zirkulierenden Gonadotropins zurückgeführt (siehe hierzu Diskussion Nonylphenol). Aber nicht nur das Vorkommen atretischer Follikel spricht in der vorliegenden Untersuchung für eine wahrscheinlich durch Octylphenol ausgelöste Verminderung des Gonadotropingehaltes im Blut. Auch das Auftreten ausschließlich primäre Oocyten tragender Ovarien bei 20 % der mit 20 µg/L Octylphenol belasteten Zebrabärblingweibchen gilt als Hinweis für eine Störung der Gonadotropinsynthese (Tam et al., 1983). Vor allem nach Gabe von 17β-Estradiol sind ausschließlich primäre Oocyten enthaltende Ovarien bei Fischen, wie der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*; Miles-Richardson et al., 1999b), dem braunen Zackenbarsch (*Epinephelus akaara*; Tam et al., 1983), dem Seebarsch (*Dicentrarchus labrax*; Blázquez et al., 1998), der Meerbrasse (*Sparus aurata*; Condeça und Canario, 1999) und dem Karpfen (*Cyprinus carpio*; Goodbred et al., 1997) beschrieben. Wie von den meisten Autoren angenommen, könnte es auch bei den Zebrabärblingen, ausgelöst durch die verminderte Ausschüttung von GtH-I, zur Ausbildung der beschriebenen „unreifen“ Ovarien gekommen sein. GtH-I ist ähnlich wie das follikelstimulierende Hormon (FSH) der Säugetiere (Junqueira und Carneiro, 1991) essentiell für das Wachstum der Oocyten (Patiño, 1997).

Aber nicht allein die ultrastrukturell und histologisch dokumentierten Veränderungen nach Octylphenol-Exposition der Zebrabärblinge sprechen für eine hormonelle Beeinträchtigung der Tiere. Auch der Rückgang der Befruchtungsrate vor allem bei Belastung der Männchen mit 100 µg/L Octylphenol und die Verminderung der Eizahlen bis zu einer Belastung mit

20 µg/L Octylphenol deutet auf eine mögliche estrogenen Wirkung hin. Rückläufige Eizahlen und Befruchtungsraten konnten auch von Gronen et al. (1999) nach Octylphenol-Exposition beobachtet werden. Wie bereits in der Diskussion der Nonylphenol-bedingten Verminderungen von Eizahlen und Befruchtungsraten erwähnt, stellen diese Parameter noch keine direkte Bedrohung für den Fortbestand der Population dar. In der Summe mit der deutlichen Erhöhung der Mortalität und Teratogenität bei den Nachkommen der belasteten Tiere lässt sich aber doch eine Verringerung des Reproduktionserfolges der Population aufzeigen, der sich im Freiland vielleicht negativ auswirken könnte. Als bedrohlichster Faktor für die Population ist wiederum die veränderte Populationsstruktur nach Octylphenol-Belastung zu werten. Nach Belastung mit 20 µg/L Octylphenol konnte ähnlich wie nach Nonylphenol-Exposition eine deutliche Zunahme der Anzahl weiblicher Tiere im Verhältnis zu den Männchen festgestellt werden. Aus der Literatur ist eine solche Verschiebung des Geschlechterverhältnisses vor allem nach hormoneller Behandlung von Fischen bekannt (Yamamoto, 1969; Schreck, 1974; Yamazaki, 1983; Hunter and Donaldson, 1987).

Wie bereits angedeutet, konnte nach Exposition der F<sub>1</sub>-Generation eine deutlich erhöhte Teratogenitäts- und Mortalitätsrate bei den Nachkommen beobachtet werden. Auch in dem unabhängig vom Life-Cycle-Experiment durchgeführten Early-Life-Stage-Test zeigte sich nach nach 6 bis 7tägiger Belastung mit 200 µg/L Octylphenol eine Letalität von 59 %. Diese Effekte können auf eine hormonelle Störung der Tiere hindeuten, sie sind aber möglicherweise auch auf eine toxische Wirkungsweise von Octylphenol zurückzuführen. Korrelieren lassen sich die Befunde mit den Ergebnissen von Gronen et al. (1999), die mit zunehmender Octylphenolbelastung von Medakas ebenfalls eine Zunahme von Entwicklungsanomalien und eine erhöhte Letalität feststellen konnten. An den Zebrabärblinglarven war nach Exposition gegenüber 200 µg/L Octylphenol im unabhängigen Early-Life-Stage-Test vor allem das vermehrte Auftreten von Augenanomalien und Ödemen zu beobachten.

Zwar gelten sowohl Augenanomalien als auch Ödeme als unspezifische Schädigungen, hervorgerufen durch eine Vielzahl von Chemikalien (von Westernhagen, 1988b) – denn gerade das Auge reagiert besonders sensibel auf teratogene Einflüsse im Vergleich zu anderen Sinnesorganen (Laale, 1977) - doch kennt man Veränderungen der Augen auch als estrogenen Effekt. So konnten beispielsweise in einer von Nishimura et al. (1997) durchgeführten Studie Augenanomalien nach Gabe von 17β-Estradiol an Krallenfroschlarven (*Xenopus laevis*) beschrieben werden. Möglicherweise bedeutet dies für die vorliegende Studie ebenso wie für die von Gronen et al. (1999) an Medakas beschriebenen Augenanomalien wie Mikrophthalmie (abnorm kleines Auge) und unilaterale Anophthalmie, dass Octylphenol auch über eine Störung des endokrinen Gleichgewichtes zu den beobachteten Anomalien geführt hat. Für eine mögliche hormonelle Beeinflussung der Zebrabärblinglarven spricht auch die hohe Teratogenitätsrate von 30 %, die nach zusätzlicher hormoneller Belastung der Nachkommen der im Life-Cycle-Test gegenüber 17β-Estradiol exponierten Eltern gezeigt werden konnte.

Im Gegensatz zu den Augenanomalien lässt sich das Auftreten der Ödeme nicht mit einem möglichen endokrinen Mechanismus in Einklang bringen. Zwar konnte die Bildung von Ödemen auch nach Behandlung von Embryonen mit Pestiziden beschrieben werden (Görge und Nagel, 1990). Pestizide stehen aber zum Teil auch im Verdacht, estrogen zu wirken (Sumpter et al., 1996; Vos et al., 2000). Doch sind Ödeme eher als unspezifische Reaktion auf einen teratogenen Einfluss zu werten (Laale, 1977), die häufig gerade nach subletaler Gabe von Schadstoffen zu beobachten sind (Strmac und Braunbeck, 1999).

Eine toxische Beeinflussung der als besonders empfindlich geltenden Embryonen und Larven (Pickering und Gast, 1972; McKim et al., 1975; McKim, 1977; Van Leeuwen et al., 1985; Suter et al., 1987; Samson und Shenker, 2000; Villalobos et al., 2000) erscheint auch deshalb nicht unwahrscheinlich, da für Octylphenol eine die Zellzykluskinetik störende Wirkung auf Zell- und Gewebestrukturen bereits gezeigt werden konnte (Colerangle und Roy, 1996; Nair-Menon et al., 1996). Auch nach *In vitro*-Inkubation von Hepatocyten aus dem Zwergwels (*Ameriurus nebulosus*) konnten nach Belastung mit 100  $\mu\text{M}$  ( $\cong$  20 mg/L Octylphenol) Schäden dokumentiert werden, die auf einen apoptotischen Zelltod hinwiesen (Toomey et al., 1999). Die von Toomey et al. (1999) untersuchten Leberzellen zeigten Veränderungen wie eine Kondensierung von Chromatin, DNA-Fragmentierung und eine Reduktion des Cytoplasmas. Die an den Hepatocyten der untersuchten Zebrabärblinge gezeigten Veränderungen deuten allerdings nicht auf eine toxische Wirkungsweise von Octylphenol hin. Schädigungen im Sinne beginnender Apoptose, wie sie ultrastrukturell beispielsweise durch das Auftreten von kondensiertem Chromatin und Blebbs gezeigt werden können (Kerr et al., 1995; Wyllie, 1980), konnten bei den mit Octylphenol belasteten Zebrabärblingen nie beobachtet werden. Außerdem lagen die von Toomey et al. (1999) getesteten toxischen Konzentrationen fast um eine Zehnerpotenz höher als in der vorliegenden Studie. Weiterhin konnten Toomey et al. (1999) selbst mit Konzentrationen, die ebenfalls noch weit über den hier untersuchten lagen, eine Induktion der Vitellogenese beobachten, aber keine toxische Schädigung der Hepatocyten.

Neben der Veränderung des Körpergewichtes stellen viele Untersuchungen die Zunahme des Lebergewichtes und des Gonadengewichtes, durch estrogen aktive Stoffe heraus. Zwar kann bei den Zebrabärblingen kein Beweis für eine Veränderung des Hepato- oder Gonadosomatischen Index geliefert werden, doch sprechen nicht quantifizierte eigene Beobachtungen für eine Veränderung der beiden Parameter unter dem Einfluss von Nonylphenol und 17 $\beta$ -Estradiol. Männchen beispielsweise, die über ihr gesamtes Leben mit 100  $\mu\text{g/L}$  Nonylphenol belastet wurden, hatten oft deutlich vergrößerte Lebern im Vergleich zu den Kontrollmännchen

Betrachtet man das Gesamtbild der aufgetretenen Effekte, muss für Octylphenol vor allem eine estrogenische Wirkungsweise angenommen werden, auch wenn eine toxische Beeinflussung nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann.