

3.4 Der Einfluss von Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf den Zebrabärbling

Zusammenfassung: Mit dem Ziel, eine mögliche Beeinflussung der Zebrabärblingspopulation durch den Steroid-Vorläufer DHEA zu zeigen, wurde ein weiterer Life-Cycle-Versuch durchgeführt. Nach Exposition gegenüber DHEA fielen in den ersten Lebenswochen keine Beeinflussungen der Zebrabärblinge im Sinne zunehmender Teratogenität und Mortalität auf. Erst nach Erreichen der Geschlechtsreife zeigten die Reproduktionsversuche deutliche Veränderungen der Eizahlen und Befruchtungsraten. Nach dem zunächst dokumentierbaren Rückgang der Befruchtungsraten (nach Behandlung mit 100 ng/L und 2 µg/L DHEA) war ab einer Belastung mit 20 µg/L eine Zunahme der Anzahl befruchteter Eier zu beobachten. Diese Tendenz ließ sich nach Kombination der belasteten Zebrabärblinge mit Kontrolltieren bestätigen. Ein Tag nach Eiablage konnte allerdings vor allem bei den Embryonen, deren Eltern mit 20 µg/L DHEA behandelt worden waren, eine Mortalitätsrate von 21 % dokumentiert werden. Zebrabärblinge, die über ihr gesamtes Leben mit 100 µg/L DHEA belastet worden waren, waren selbst nach einer Regenerationszeit von 4 Wochen nicht mehr in der Lage, Eier abzulegen.

Auch bei der Geschlechterzusammensetzung zeigten sich die stärksten Effekte nach Exposition der Tiere gegenüber 100 µg/L DHEA. Neben einer deutlichen Verschiebung zugunsten der weiblichen Tiere konnte erstmalig auch das Auftreten von Ovotestes bei 14 % der Tiere und damit 70 % der makroskopisch als männlich definierten Individuen dokumentiert werden. Des Weiteren waren strukturelle Veränderungen der Hoden in Form dicht mit Spermien angefüllter Tubuli seminiferi bereits nach Exposition der Zebrabärblingsmännchen gegenüber 2 µg/L DHEA erkennbar. In den Ovarien der mit der gleichen DHEA-Menge behandelten Weibchen fiel vor allem die hohe Anzahl reifer Oocyten im Verhältnis zu anderen Reifestadien auf. Weiterhin konnten bei diesen Tieren bereits beginnende Degenerationserscheinungen in Form atretischer Follikel nachgewiesen werden. Das Auftreten von Atresie nahm in dosisabhängiger Weise zu.

Als deutlichster Effekt auf ultrastruktureller Ebene der Leber ist das Auftreten von Steatose, d. h. Lipideinschlüsse enthaltender rER-Zisternen bei den männlichen Zebrabärblingen nach Belastung mit 100 µg/L DHEA zu werten. Weiterhin konnten nach DHEA-Exposition auch Skelettanomalien und eine Zunahme des Konditionsfaktors, vor allem bei den Weibchen beschrieben werden.

3.4.1 DHEA - ein Zwischenprodukt des Steroidmetabolismus: „Verjüngungsspielle“ oder „endocrine disruptor“

Bei Fischen ist die Entwicklung des Geschlechtes im Gegensatz zu den Säugetieren sehr variabel und von vielen Faktoren abhängig. Kommt es zur Ausprägung des einen oder anderen Geschlechtes, ist dies kein endgültiger Zustand, sondern bei einer Reihe von Fischarten aufgrund endo- oder exogener Einflüsse veränderbar (Baroiller et al., 1999). Bereits in der Entwicklung der Geschlechtlichkeit zeichnen sich die Fische durch sehr unterschiedliche Strategien aus (Yamamoto, 1969). Während einige Fischarten eine direkte Entwicklung zu Männchen oder Weibchen durchlaufen, findet man bei vielen anderen Fischen neben dem synchronen Hermaphroditismus, in dem beide Gonadentypen in funktionsfähiger Form parallel angelegt sind, auch proterandrische und protogyne Zwitter, d. h. Tiere, die in ihrer Entwicklung zunächst ein männliches und später ein weibliches Stadium durchlaufen oder umgekehrt (Baroiller et al., 1999). Weiterhin kommt bei Fischen eine Form der Entwicklung vor, die als Gonochorismus bezeichnet wird. Gonochoristen, zu denen beispielsweise auch der Zebraäbrbling (Takahashi, 1977) und der Medaka gehören, durchlaufen während ihrer Entwicklung zunächst ein Stadium, in dem eine undifferenzierte Gonade angelegt wird (Chan und Yeung, 1983; Sadovy und Shapiro, 1987; Baroiller et al., 1999).

Ob Getrenntgeschlechtlichkeit, Hermaphroditismus oder Gonochorismus vorliegt, entscheidet bei den Fischen nicht allein die genetische Determination, die im Gegensatz zu den Säugetieren auch sehr viel variabler ist (Baroiller et al., 1999). Während männliche Säugetiere immer zwei unterschiedliche Geschlechtschromosomen (XY) tragen, wie es beispielsweise auch bei den Salmoniden der Fall ist, findet man bei einer ganzen Reihe von Fischen, beispielsweise *Gambusia*, einer zu den Zahnkärpflingen gehörenden Familie, weibliche Heterogameten (ZW; Baroiller et al., 1999). Auch das Vorkommen mehrerer für das Geschlecht codierender Chromosomen (polychromosomale Determination) und Chromosomen mit multipler Funktion kann bei Fischen beobachtet werden (Kallman, 1984).

Dass die Gene bei der Ausprägung des Geschlechtes der Fische eine weit geringere Rolle spielen als bei Säugetieren (Jost, 1972; Jost et al., 1973; Bull, 1983; Shapiro, 1992), zeigt sich in den oft vorhandenen Unterschieden zwischen geschlechtlichem Genotyp und der phenotypischen Gonadenausprägung (Baroiller et al., 1999). Grund hierfür ist die starke Wirkung endogener und exogener Faktoren wie der Umgebungstemperatur, des pH-Werts, der Lichtperiode und sozialer Einflüsse auf die Geschlechterentwicklung. Steroide beispielsweise scheinen bei der Geschlechterdifferenzierung bzw. der Induktion der Geschlechtsumkehr bei Hermaphroditen eine sehr wesentliche Rolle zu spielen (Yamamoto, 1969). So kommt es unter dem Einfluss von Estrogenen zur Entwicklung weiblicher Gonaden, während Androgene die Entstehung von Hoden bedingen. Diese Bedeutung der Steroide konnte in zahlreichen Experimenten gezeigt werden, in denen Fische unter dem Einfluss exogener Hormone aufge-

zogen wurden (Yamamoto, 1969). Hier war es, beispielsweise durch Estrogeneinwirkung möglich, Populationen zu erzeugen, in denen ausschließlich weibliche Tiere auftraten (Yamamoto, 1969; Nakamura, 1981).

Ein anderes Steroid, das den Metabolismus der Fische beeinflussen kann (Yamamoto, 1969; Chan und Yeung, 1983), ist DHEA. Beim Menschen übernimmt DHEA die Rolle eines plasmatischen inaktiven Speicherstoffes, der bei Bedarf innerhalb der Zielgewebe intrakrin ähnlich wie bei Fischen zu Testosteron oder Estradiol metabolisiert wird (Labrie et al., 1998). Die Rolle von DHEA wird deutlich, wenn man die Mengen beachtet, die im Körper des Menschen nachgewiesen werden können. Während bei Männern DHEA in ca. 100 – 500facher Testosteronmenge nachgewiesen werden konnte, fand man bei Frauen sogar die im Vergleich zu Estradiol 1000 – 10.000fache Menge (Labrie et al., 1998). Ab einem Alter von ca. 20 Jahren nimmt die DHEA-Menge allerdings in starkem Maße ab (Vermeulen und Verdonck, 1976; Bélanger et al., 1994), was im Laufe der Zeit zu starken Beeinträchtigungen führen kann (Labrie et al., 1998). Beispielsweise steigt die Wahrscheinlichkeit für Krankheiten wie Fettleber und Depression, aber auch das Risiko für Brust- und Prostatakrebs bedingt durch das Fehlen der DHEA-Metaboliten Estradiol und Testosteron (Zumoff et al., 1981; Nestler et al., 1988; Schriock et al., 1988; Stahl et al., 1992; Casson et al., 1993; Labrie et al., 1998). Um diesen Erscheinungen entgegen zu wirken, eignet sich die Gabe von DHEA in Form von Medikamenten (Morales et al., 1994; Diamond et al., 1996; Labrie et al., 1997), die sich, wenn sie in die Umwelt gelangen, aber auch direkt auf Fische auswirken können. Um aufzuzeigen, welche Auswirkungen dies sein können, wurde ein Life-Cycle-Experiment mit dem Hormonvorläufer durchgeführt.

3.4.2 Life-Cycle-Test mit DHEA

Der Life-Cycle-Versuch wurde entsprechend der in Kap. 2 beschriebenen Methodik durchgeführt. Ablauf und erhobene Parameter entsprachen dem in Abbildung 3.2.1 dargestellten Schema in Kapitel 3.2. Die Testkonzentrationen richteten sich nach den beiden zuvor durchgeführten Life-Cycle-Experimenten mit Nonylphenol und Octylphenol. Ein LC₅₀-Test mit 100, 200, 300, 400 und 500 µg/L DHEA an adulten Zebraabrärlingen führte weder zu Letalität noch zu sonstigen offensichtlichen Beeinträchtigungen der Tiere.

Während des Life-Cycle-Versuchs wurde die DHEA-Konzentration in den Aquarien 2× analysiert. Eine Analyse fand im Wasseranalyzelabor der Firma GC-Analysen (Starnberg) statt, eine weitere im Hygieneinstitut der Universität Heidelberg, durch Herrn Rastall (Tab. 3.4.1).

Tabelle 3.4.1: 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 [$\mu\text{g/L}$]
0,1	n. n.	0,08
2	2,0/1,4	2,4
20	15/16	34
100	44/56	118,8

3.4.2.1 Embryonal-, Larval- und Juvenilphase (bis 16 d) unter statischer Belastung mit DHEA und DMSO

Zu Beginn des Versuches wurden im Doppelansatz zunächst jeweils 120 bzw. 100 Eier mit 0,1 $\mu\text{g/L}$, 2 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ und 100 $\mu\text{g/L}$ DHEA und 0,02 % DMSO belastet. Weitere 120 Eier blieben unbelastet. Die unbefruchteten Eier wurden ca. 6 Stunden nach Eiablage aussortiert; übrig blieb die in Tabelle 3.4.2 aufgeführte Anzahl befruchteter Eier. Da zwei Tage nach Exposition keine Schädigung der Eier festgestellt werden konnte, wurde jeweils ein Ansatz jeder Testkonzentration verworfen. Jeweils 120 Embryonen wurden weiter belastet. Eine erhöhte, wahrscheinlich schadstoffunabhängige Mortalität, konnte erst ab der zweiten Lebenswoche dokumentiert werden.

Tabelle 3.4.2.: Embryonal-, Larval- und Juvenilentwicklung der Zebrabärblinge unter Exposition gegenüber DHEA.

	H ₂ O	DHEA				
		DMSO 0,02 %	1 ng/L	2 $\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$
Anzahl befruchteter Eier (n)	113	173	169	161	181	165
Anzahl verworfener Eier (n)	13	53	49	41	61	45
Anzahl (n) geschlüpfter Larven, 4 Tage nach Eiablage	63	71	28	48	47	28
Missgebildete Larven (n)	-	-	1	-	1	-
Mortalität - 2. Lebenswoche (n)	-	30	46	16	33	33
Umgesetzte Jungfische (Durchfluss; n)	62	62	66	62	62	62

Ähnlich zu dem zuvor durchgeführten Life-Cycle-Versuch mit Octylphenol war auch hier die Sterblichkeit der juvenilen Fische in der zweiten Lebenswoche mit bis zu 27 % relativ hoch. Da aber auch hier eine ähnlich hohe Mortalität bei den Kontrolltieren zu verzeichnen war, wurde der Versuch weitergeführt und die Fische am 17. Tag nach Eiablage in die Durchflusssanlage umgesetzt.

3.4.2.2 Juvenil- und Adultphase (ab 17 d) unter kontinuierlicher Belastung mit DHEA im Durchflusssystem

Die Fische blieben unter kontinuierlicher Belastung bis zum Erreichen der Geschlechtsreife 4 Monate nach Versuchsbeginn. Während der Durchflussphase waren keine Veränderungen von Verhalten und Morphologie an den DHEA-exponierten Zebrabärblingen zu erkennen. Die Tiere zeigten normales Wachstum und Entwicklung.

3.4.2.3 Reproduktionstests zur Ermittlung der Reproduktionsfähigkeit DHEA-exponierter Zebrabärblinge

Zur Ermittlung der Reproduktionsfähigkeit wurden zunächst nacheinander jeweils 8 adulte geschlechtsreife Zebrabärblingsbrutpaare aus jedem Versuchsansatz des Life-Cycle-Tests in die Zuchtanlage überführt. In Abänderung zu den Life-Cycle-Versuchen mit Nonylphenol und Octylphenol bestand ein Brutpaar aus jeweils einem Männchen und einem Weibchen. In einer weiteren Versuchsreihe wurden an jedem Versuchstag Brutpaare aus jedem Versuchsansatz parallel getestet, um eine höhere Vergleichbarkeit der Daten zu erhalten.

Die Ergebnisse aus beiden Testreihen wichen allerdings nicht voneinander ab, so dass die Versuche zusammen ausgewertet werden konnten.

Auch wenn sich nach der statistischen Bewertung mit Ausnahme der Tiere, die über das gesamte Leben mit 100 µg/L DHEA belastet worden waren, keine signifikanten Veränderungen ergaben, zeigten sich doch Trends vor allem bei der Anzahl befruchteter Eier (Abb. 3.4.1). Zebrabärblingspaare, die kontinuierlich mit 0,1 µg/L DHEA behandelt worden waren, konnten um ca. 10 % weniger Eier befruchten als die Kontrolltiere, die Befruchtungsraten von ca. 45 % erzielten. Allerdings zeigte sich diese Tendenz bei den gegenüber 2 und 20 µg/L DHEA exponierten Fischen nicht. Zwar waren nach Exposition mit 2 µg/L mit 38 % noch immer weniger Eier befruchtet als bei den Kontrollgruppen, doch konnten die aus dem 20 µg/L DHEA-Testansatz stammenden Brutpaare ihre Eier zu einem höheren Prozentsatz befruchten als die Kontrollen. Ein deutlicher Einbruch war bei den mit 100 µg/L DHEA belasteten Fischen zu verzeichnen, hier blieben alle Brutpaare bei der Eiablage erfolglos.

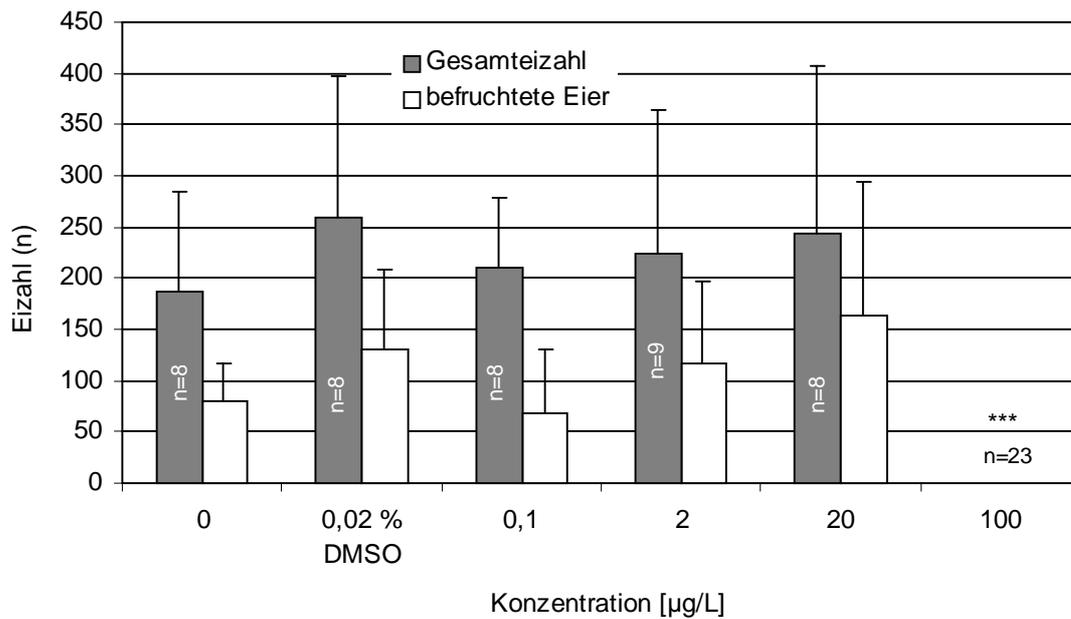


Abbildung 3.4.1.: Eizahl und Befruchtungsrate bei Zebrafärblingen (*Danio rerio*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA und DMSO. n = Anzahl erfolgreich laichender Brutpaare. Signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen nach dem Student's t-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Mit dem Ziel, den geschlechterspezifischen Einfluss von DHEA zu zeigen, wurden Kombinationsversuche durchgeführt, in denen aus verschiedenen Testansätzen stammende Männchen und Weibchen miteinander verpaart wurden (Abb. 3.4.2). Diese Versuche zeigten noch einmal deutlich die durch 100 µg/L DHEA hervorgerufene Legehemmung der Weibchen, die sogar in Kombination mit männlichen Kontrolltieren nicht zur Eiablage fähig waren. Auch die gegenüber 100 µg/L DHEA belasteten Männchen waren nach dem Verpaaren mit Weibchen der anderen Testansätze nicht in der Lage, die Eiablage zu stimulieren und die abgelegten Eier zu befruchten. Zur nochmaligen Absicherung der Ergebnisse wurden die mit 100 µg/L DHEA belasteten Weibchen zusätzlich zu den oben beschriebenen Test noch weitere 12 × mit gleich belasteten Männchen verpaart und weiter 5 × mit Kontrollmännchen. Weiterhin wurde nach einer Regenerationsphase von 4 Wochen ein erneuter Versuch mit 8 Brutpaaren aus belasteten Weibchen und Kontrollmännchen, durchgeführt. Die belasteten Männchen konnten nicht nochmals getestet werden, da sie aufgrund der geringen Anzahl für die histologische und ultrastrukturelle Aufarbeitung am Ende der Expositionszeit entnommen werden mussten. Bei keinem der Ansätze waren die Weibchen in der Lage, Eier abzulegen, und es muss somit als gesichert angesehen werden, dass es durch den lebenslangen Einfluss von 100 µg/L DHEA zu einer irreversiblen Störung der Reproduktionsfähigkeit der weiblichen Zebrafärblingen gekommen ist. Im Gegensatz zu den weiblichen DHEA-exponierten Tieren war bei den Männchen, die mit 2 und 20 µg/L DHEA belastet waren, eine eher positive Beeinflussung durch DHEA zu beobachten:

A

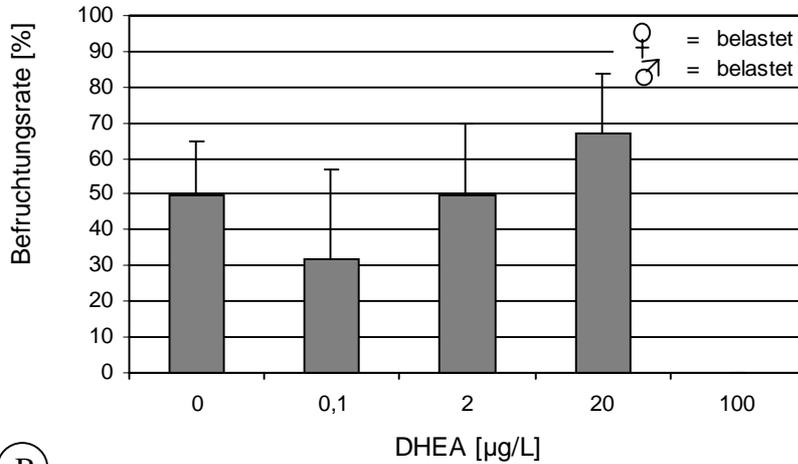
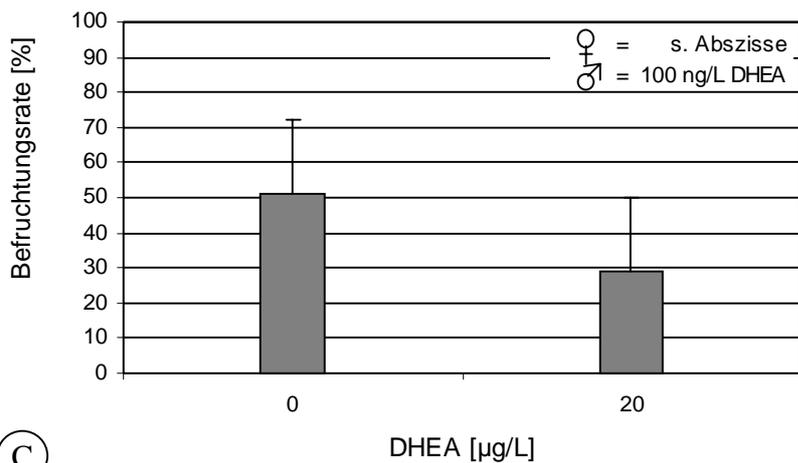


Abbildung 3.4.2: Befruchtungsrate bei Zebraabärblingen (*Danio rerio*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA

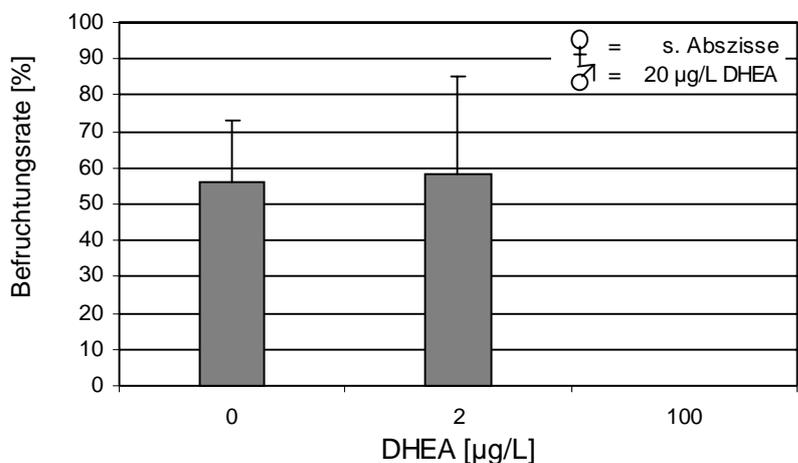
A. Nach Verpaaren DHEA-exponierter Männchen und Weibchen und den Kontrollen.

B



B. Nach Verpaaren 100 ng/L DHEA-exponierter Männchen mit Kontroll- und 20 µg/L DHEA-belasteten Weibchen.

C



C. Nach Verpaaren 20 µg/L DHEA-exponierter Männchen mit Kontroll- 2 µg/L und 100 µg/L DHEA-belasteten Weibchen

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.

In Kombination mit weiblichen Kontrolltieren waren Eizahlen und Befruchtungsraten (Abb. 3.4.2) immer höher als bei den Kontrollpaaren. Nur bei der Kombination der mit 100 ng/L DHEA behandelten Männchen mit 20 µg/L DHEA-belasteten Weibchen war ein Rückgang der Befruchtungsrate zu erkennen (Abb. 3.4.2). Auch wenn sich diese Beobachtungen nicht eindeutig statistisch absichern lassen, so wird doch der beschriebene Trend in Abbildung 3.4.2 deutlich.

3.4.2.4 Anomalien in Schlupf und Entwicklung der F₂-Generation

Zur Dokumentation eventuell auftretender Entwicklungsanomalien innerhalb der ersten Lebenswoche wurden alle Eier aus den Reproduktionsversuchen aufbewahrt und über den Zeitraum von einer Woche täglich untersucht. Alle Ansätze blieben während dieser Zeit unbelastet. Die Hälterung der Eier erfolgte, wie für die F₁-Generation beschrieben, in Petrischalen.

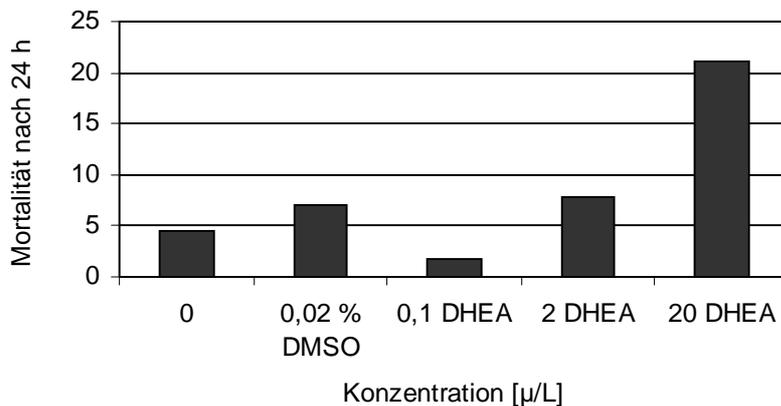


Abbildung 3.4.3: Mortalität der Embryonen in den ersten 24 h nach Eiablage. Erkennbar waren die abgestorbenen Eier am Koagulieren der Eier, die am Vortag als befruchtet bestimmt worden waren.

Vor allem nach Exposition der Elterntiere gegenüber 20 µg/L DHEA war das Absterben der Embryonen bereits ein Tag nach Eiablage erkennbar (Abb. 3.4.3). Die Anzahl dieser, als koagulierte sichtbaren Eier, war mit zum Teil 20 % so hoch dass ein Fehler beim Aussortieren

am Vortag sicher ausgeschlossen werden kann. Hier muss durch den DHEA-Einfluss auf die Elterntiere eine Beeinträchtigung der Embryonen in den frühen Zellteilungsphasen stattgefunden haben. Bei den überlebenden Embryonen zeichneten sich am 2. Tag nach der Eiablage weitere Beeinträchtigungen im Vergleich zu den Kontrollembryonen ab. Während die Kontrollen zu diesem Zeitpunkt schon deutlich pigmentiert waren, war bei ca. 30 % der Embryonen, deren Eltern mit 20 µg/L DHEA belastet worden waren, nur eine sehr schwache Pigmentierung zu erkennen.

3.4.2.5 Geschlechterverhältnis der F₁-Generation im Alter von 4 Monaten

4 Monate nach Versuchsbeginn waren alle gegenüber DHEA exponierten Zebrabärblinge sowie die Wasser- und DMSO-Kontrolltiere geschlechtsreif, was die Reproduktionstests zeigten, die mit Ausnahme der mit 100 µg/L belasteten Fische erfolgreich verlaufen waren. Bei der Ermittlung der Geschlechter, was zunächst makroskopisch nach dem Eröffnen der Tiere stattfand, ergab sich bei diesem Versuch in allen Ansätzen ein Überhang weiblicher Tiere, der nach Belastung mit DHEA zunahm. Bei der späteren histologischen Auswertung des Versuches zeigte sich, dass 14 % der gegenüber 100 µg/L DHEA exponierten Zebrabärblinge Ovotestes trugen und somit Hermaphroditen waren. Diese Tiere waren zuvor alle makroskopisch als Männchen bestimmt worden. Nach Korrektur der Befunde ergab sich die nachstehend aufgeführte Graphik (Abb. 3.4.4).

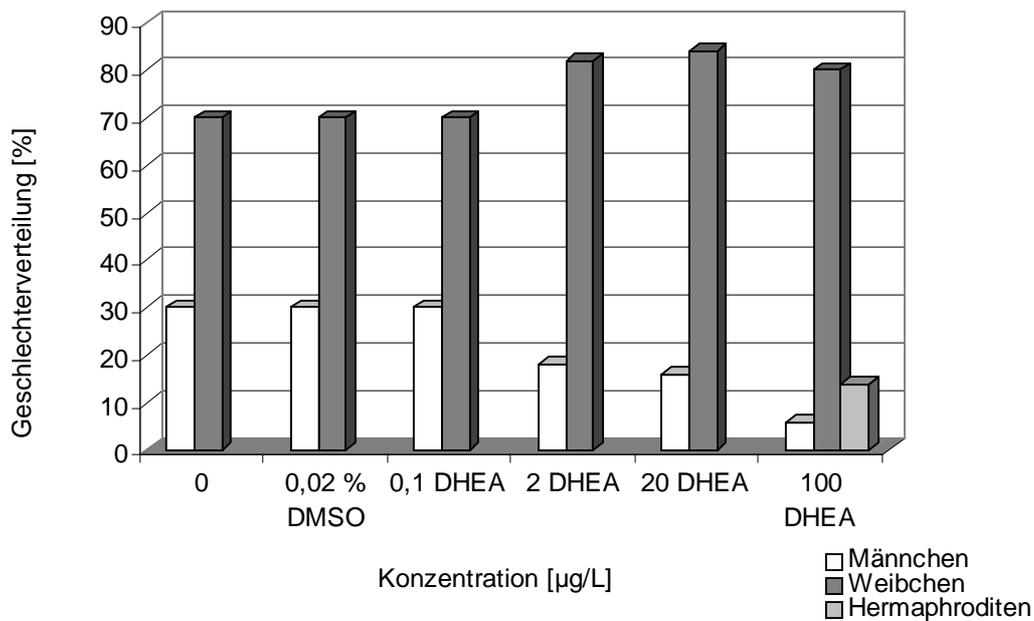


Abbildung 3.4.4: Geschlechterverteilung (in %), nach 5 monatiger Belastung der Zebrabärblinge mit 0,1, 2, 20 und 100 µg/L DHEA und 0,02 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle.

3.4.2.6 Gewichts- und Längenverteilung der F₁-Generation nach 4monatiger kontinuierlicher Belastung mit DHEA

Nach Bestimmung von Gewicht und Länge der entnommenen Tiere zeigten sich zum Teil signifikante Veränderungen nach DHEA-Belastung im Verhältnis zu den Kontrolltieren, vor allem bei den Weibchen. Diese Signifikanzen blieben auch bei der Ermittlung der Konditionsfaktoren erhalten. Durch den Einfluss von DHEA war es also zu einer signifikanten Gewichtszunahme bei den Weibchen gekommen. Bei den Männchen war dieser Effekt nicht zu beobachten. An dieser Stelle muss allerdings noch angemerkt werden, dass auch die Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO zu einem signifikanten Gewichtsanstieg geführt hatte. Dieser Effekt konnte bereits nach dem Life-Cycle-Versuch mit Nonylphenol beschrieben werden. Entsprechend den Befunden mit Nonylphenol war jedoch auch durch den Einfluss von DHEA eine weitere Gewichtszunahme zu verzeichnen. Denn nach dem Vergleich der belasteten Tiere mit den lösungsmittelbehandelten Fischen ließen sich zum Teil wieder signifikante Unterschiede nachweisen. Am deutlichsten zeigte sich der Schadstoffeffekt nach dem Vergleich von Gewicht und Länge der gegenüber 100 µg/L DHEA exponierten Zebrabärblingsweibchen mit den DMSO-Weibchen (Tab. 3.4.3). Hier konnte eine signifikante Erhöhung beider Parameter bestimmt werden.

Bei der Betrachtung der Konditionsfaktoren fiel eine stetig zunehmende, signifikante Gewichtszunahme bei den weiblichen Tieren bis zu einer Belastung mit 20 µg/L DHEA auf. Bei den Männchen war eine tendenzielle und nur im Fall der mit 2 µg/L DHEA belasteten Tiere eine signifikante Erhöhung der Konditionsfaktoren zu beobachten (Abb. 3.4.5)

Tabelle 3.4.3: Gewicht und Länge der Zebrabärblinge der F₁-Generation (Alter: 4 Monate) Belastung mit DHEA und DMSO während des gesamten Lebenszyklus.

	Gewicht [g]		Länge [cm]	
	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
Kontrolle	0,48 ± 0,06	0,49 ± 0,03	3,6 ± 0,11	4,0 ± 0,07
0,02 % DMSO	0,62 ± 0,07 ^{***1}	0,48 ± 0,03	3,9 ± 0,14 ^{***1}	3,8 ± 0,13
0,1 µg/L DHEA	0,62 ± 0,09 ^{***}	0,45 ± 0,06	3,8 ± 0,14 ^{***}	3,7 ± 0,16 ^{***}
2 µg/L DHEA	0,65 ± 0,01 ^{***}	0,42 ± 0,05 ^{***}	3,9 ± 0,16 ^{***}	3,6 ± 0,12 ^{***}
20 µg/L DHEA	0,68 ± 0,08 ^{***}	0,50 ± 0,09	3,9 ± 0,18 ^{***}	3,8 ± 0,14 ^{**}
100 µg/L DHEA	0,71 ± 1,00 ^{**}	0,51 ± 0,08	4,0 ± 0,16 ^{**}	3,9 ± 0,16

Signifikanz der Unterschiede zu den DMSO-Kontrollen, bzw. im Fall der gegenüber 100 ng/L DHEA exponierten Zebrabärblinge zu den Wasserkontrollen, nach Student's t-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

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

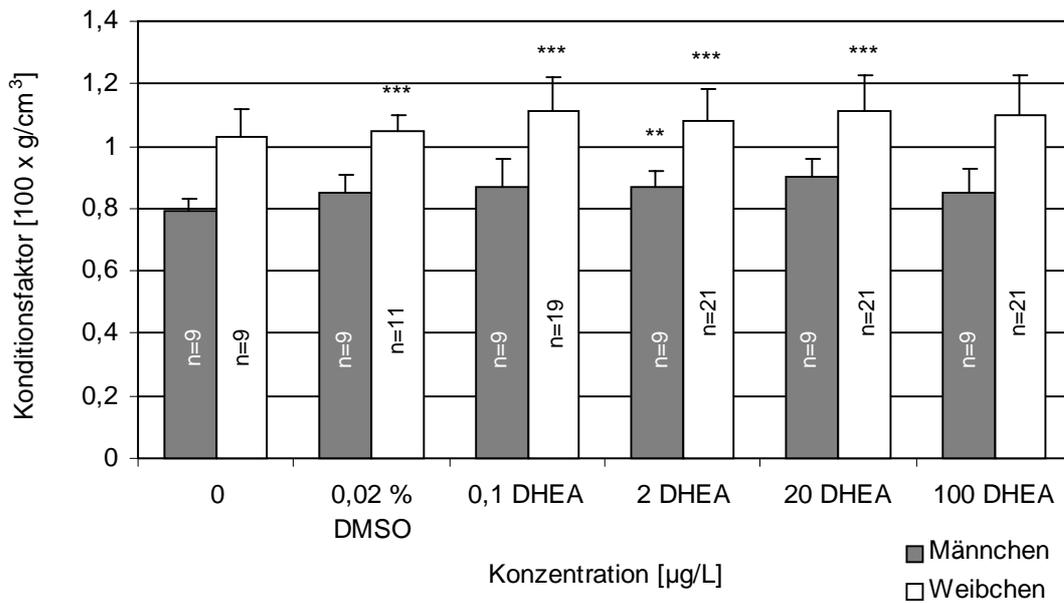


Abbildung 3.4.5: Konditionsfaktor aller entnommen Versuchstiere nach Ende des Life-Cycle-Versuchs. Signifikante Veränderungen zu den Negativkontrollen sind mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Anmerkung: Die bei den Weibchen aufgeführten Signifikanzen bei den Konditionsfaktoren der Fische aus den Ansätzen 2 und 20 µg/L DHEA gelten im Bezug auf die Wasserkontrollen. Zu den DMSO-Kontrollen ergaben sich hier keine signifikanten Unterschiede. Gleiches gilt für den Vergleich der Konditionsfaktoren der mit 2 µg/L DHEA belasteten Männchen.

3.4.2.7 Histologische Befunde der Gonaden der Zebraärblinge der F_1 -Generation

Kontrolltiere

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

Weibchen nach Belastung mit 100 ng/L DHEA

Die Ovarien der weiblichen Zebraärblinge zeigten nach Belastung mit 100 ng/L DHEA eine veränderte Oocytenzusammensetzung. Häufig waren Oocyten der Reifestufe III zu beobachten, während Eizellen der Reifestufen I und II nur in geringer Anzahl dokumentiert werden konnten (Bildtafel 31, Bild a). Teilweise waren in den reifen Oocyten bereits Anzeichen beginnender Atresie sichtbar.

Männchen nach Belastung mit 100 ng/L DHEA

Bei den männlichen Zebrabärblingen waren bereits ab einer Belastung mit 100 ng/L DHEA deutliche Veränderungen der Hodenstruktur zu erkennen, wie sie bereits nach 100 µg/L Nonylphenol-Belastung und Octylphenol ab 20 µg/L beschrieben werden konnten. Die Hoden sowie die Hodentubuli waren nicht mehr langgestreckt sondern rund. In einigen Bereich der Hoden schienen die Tubuli auch verkleinert. Dadurch wirkten die Hoden der gegenüber 100 ng/L DHEA exponierten Zebrabärblingmännchen bereits stark zergliedert. Die Tubuli seminiferi waren immer prall mit Spermien angefüllt. Unreif erscheinender Hoden konnten nie dokumentiert werden.

Weibchen nach Belastung mit ≥ 2 µg/L DHEA

Die bereits in den Zebrabärblingsweibchen nach Behandlung mit 100 ng/L DHEA festgestellte Dominanz der reifen Oocyten im Vergleich zu den in den Reifestufen I und II befindlichen Eizellen konnte weiterhin dokumentiert werden (Bildtafel 31, Bild b). Auffällig war allerdings das zunehmende Auftreten atretischer Follikel innerhalb der Ovarien (Bildtafel 31, Bild b – g). Bei einem Weibchen konnte ein „brauner Körper“ dokumentiert werden (Bild 31e), der aus einem atretischen Follikel entstehen kann (vergl. Abb. 3.2.12).

Bildtafel 31: Querschnitt durch die Ovarien von Zebrabärblingsweibchen: **a:** nach Exposition gegenüber 100 ng/L DHEA. Erkennbar sind die verschiedenen Reifestufen der Oocyten. Eizellen der Reifestufe III, sind im Vergleich zu den Kontroll ovarien in deutlich erhöhter Anzahl zu sehen. Eine Oocyte zeigt Anzeichen beginnender Atresie (★; Vergrößerung: 26 ×). **b:** nach Belastung mit 2 µg/L DHEA. Zu sehen sind zwei atretische Follikel des II. Stadiums (★). Auffällig sind die hypertrophen Thekazellen (▶; Vergrößerung: 45 ×). **c:** nach Belastung mit 2 µg/L DHEA. Atretischer Follikel einer reifen Oocyte (Vergrößerung: 80 ×). **d:** nach Exposition gegenüber 2 µg/L DHEA. Atretischer Follikel Typ I, mit deutlicher Hypertrophie der Granulosazellen (→). Von der Oocyte sind nur noch die Dottertropfen erkennbar (★; Vergrößerung: 500 ×). **e:** nach Belastung mit 2 µg/L DHEA. Neben Oocyten der Reifestufe I, II und III ist ein „brauner Körper“ zu erkennen (★, ▶; Vergrößerung: 106 ×). **f:** nach Belastung mit 100 µg/L DHEA. Dargestellt ist ein Corpus atreticum, Typ II. Neben Dottertropfen (★) und Chorion (▶) sind die pyknotischen Kerne der Thekazellen sichtbar (→; Vergrößerung: 232 ×).

Bildtafel 31: DHEA Ovar.

Hermaphroditen nach Belastung mit 100 µg/L DHEA

Die nach Exposition gegenüber 100 µg/L DHEA auftretenden Zwitter trugen Ovotestes, in denen Hodengewebe und Oocyten der Reifestufe I nachgewiesen werden konnten (Bildtafel 32). In 80 % der Ovotestes war eine Dominanz der Oocyten zu erkennen, die ca. 2/3 des Ovotestes-Volumens (Bild 32a, c) ausfüllten. Das angelegte Hodengewebe schien intakt. Zum Teil waren Tubuli seminiferi angelegt, die in ihrem Lumen Spermien trugen. Bei 20 % der Ovotestis-tragenden Zebrabärblinge konnten nur vereinzelt Oocyten in sonst normal organisiertem Hodengewebe nachgewiesen werden (Bild 32b).

Männchen nach Belastung mit ≥ 2 µg/L DHEA

Die veränderte Hodenstruktur stellte sich ab einer Belastung mit 2 µg/L DHEA noch deutlicher dar als für die gegenüber 100 ng/L DHEA exponierten Zebrabärblingsmännchen beschrieben. Im Gesamtbild wirkten die Hoden stark zergliedert (Bildtafel 33, Bild a, b, c), so dass die Organisation der Tubuli fast nicht mehr erkennbar war. Die Tubuli eines Hodens waren zum Teil dicht mit Spermien angefüllt, zum Teil aber fast vollständig leer (Bild 33a).

Bildtafel 32: Querschnitt durch Zebrabärblings-Ovotestes nach Exposition gegenüber 100 µg/L DHEA. **a:** Zu erkennen ist eine deutliche Dominanz des ovariellen Gewebes. Es sind ausschließlich Oocyten der Reifestufe I zu erkennen. Die Hodengewebe-tragenden Bereiche der Gonade enthalten alle Spermatogenese-Stadien. Spermien sind in hoher Anzahl zu erkennen (Vergrößerung: 150 ×). **b:** Im normal entwickelten Hodengewebe ist eine Oocyte der Reifestufe I zu erkennen (Vergrößerung: 190 ×). **c:** Oocyten der Reifestufe I liegen zwischen normal entwickeltem Hodengewebe. Im Hodengewebe sind neben den unterschiedlichen, die Spermatogenese durchlaufenden Zellpopulationen, Spermien in den Tubuli seminiferi zu erkennen (Vergrößerung: 266 ×).

Bildtafel 35: *Beschreibung siehe Seite 162.*

Bildtafel 32: Hoden DHEA

Bildtafel 33: Querschnitte durch den Hoden von über den gesamten Lebenszyklus mit 2 µg/L DHEA belasteten männlichen Zebrafärblingen. Zu erkennen sind die unterschiedlichen Spermatogenesestadien, die wie folgt gekennzeichnet sind: 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:** Stark komprimierter Hoden mit Tubuli die entweder dicht mit Spermien angefüllt sind, oder nur geringe Spermienmengen enthalten (Vergrößerung: 160 ×). **b** und **c:** Hodentubuli die nur wenige Spermien tragen. Die Tubuli sind stark verkleinert und anders organisiert als die der Kontrolltiere (Vergrößerung: **b:** 500 ×; **c:** 400 ×).

Bildtafel 32: Ovotestes

3.4.2.8 *Ultrastrukturelle Veränderungen der Leber nach DHEA-Behandlung*

Leber unbelasteter Zebrabärblinge

Zur Ultrastruktur der Leber der Kontrolltiere siehe Kapitel 3.3.2.11.

Leber weiblicher Zebrabärblinge nach Belastung mit 100 µg/L DHEA

In der Leber von 60 % der untersuchten weiblichen Individuen, die mit 100 µg/L DHEA belastet worden waren, waren leichte Veränderungen des rauhen endoplasmatischen Retikulums zu erkennen (Bildtafel 34; Bild a).

In den Hepatocyten der übrigen 40 % der Zebrabärblingsweibchen stellte sich das rauhe endoplasmatische Retikulum (rER) nicht mehr so deutlich wie bei den Kontrolltieren in Form dicht gepackter Stapel, langgestreckter und ununterbrochener Zisternen in Kernnähe dar, sondern war fenestriert und zum Teil fragmentiert über die gesamte Zelle verteilt (Bild 34d). Golgi-Apparate waren in hoher Zahl in jeder Zelle dokumentierbar und zeigten eine starke Vesikelbildung, wobei die Vesikel unterschiedliche Elektronendichte aufwiesen (Bild 34d). Die zwischen den rER-Zisternen gelegenen Mitochondrien zeigten keine Veränderungen zu denen der Kontrolltiere. In allen Zellen waren neben geringen Mengen Glykogen Lipidtropfen in hoher Anzahl nachweisbar. Peroxisomen und lysosomale Elemente konnten nur selten beobachtet werden (Tab. 3.4.4).

Leber männlicher Zebrabärblinge nach Belastung mit 100 µg/L DHEA

In der Leber von 40 % der untersuchten männlichen Individuen, die mit 100 µg/L DHEA behandelt worden waren, wiesen die Hepatocyten nur geringfügige Unterschiede in der Menge des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) und der Golgi-Apparate im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Die Zellen enthielten ähnlich wie die der Kontrolltiere immer große Mengen an Glykogen, allerdings konnte im Unterschied zu den Kontrollen auch das vermehrte Auftreten von Lipidtropfen dokumentiert werden (Tab. 3.4.4). Besonders auffällig und erstmalig im Rahmen dieser Dissertation konnte Lipid auch innerhalb des rER beobachtet werden (Bildtafel 35, Bild a - d). Dieser Effekt wird in der Literatur als Steatose bezeichnet. Nach morphometrischer Aufarbeitung konnte eine Zunahme der Mitochondrienanzahl sowie eine Proliferation der Peroxisomen gezeigt werden (Berbner, Zoologie I). Es war also eine Zunahme aller in den Lipidmetabolismus involvierter Strukturen der Zelle erkennbar.

In den Leberzellen von 60 % der Zebrabärblingsmännchen, war eine Zunahme des rauhen endoplasmatischen Retikulums im Vergleich zu den Kontrollmännchen zu erkennen (Bildtafel 34, Bild b). Die Menge des rER blieb allerdings unter der an den weiblichen Kontrolltieren

dokumentierten zurück. Die meist stapelförmig organisierten rER-Zisternen waren im Gegensatz zu den Kontrollweibchen auch nicht bevorzugt in Kernnähe anzutreffen, sondern lagen meist peripher entlang der Zellmembran der Hepatocyten. Meist war eine Fenestrierung der Zisternen und zum Teil an einigen Stellen eine Fragmentierung zu beobachten. Golgi-Felder konnten in großer Menge dokumentiert werden, ihre Zisternen waren nie dilatiert. An den Golgi-Zisternen war eine rege Vesikelbildung zu beobachten. Bei der Zusammensetzung der Speicherstoffe fiel neben dem hohen Glykogengehalt der Zellen die Einlagerung von Lipidtropfen auf (Tab. 3.4.4).

Leber hermaphroditer Zebrabärblinge nach Belastung mit 100 µg/L DHEA

Die Hepatocyten der Mischgonaden-tragenden Zebrabärblinge fielen vor allem durch die starke Veränderung der rER-Zusammensetzung auf (Bildtafel 34, Bild c). Die in den Kontrollzellen beobachtete Stapelbildung der ununterbrochenen rER-Zisternen war nicht mehr zu beobachten. Das rER war immer stark fragmentiert und über die gesamte Zelle verteilt. In der Nähe des Zellkerns waren häufig ausgedehnte Golgi-Felder mit zum Teil dilatierten Zisternen und einer starken Vesikelbildung zu erkennen (Bild 34c). Einige der Vesikel erschienen durch die erhöhte Elektronendichte dunkelgrau. Zwischen den rER-Fragmenten konnten vermehrt Peroxisomen dokumentiert werden (Bild 34c).

Bildtafel 34: Hepatocyten von, mit DHEA belasteten Zebrabärblingen. **a:** Im Vergleich zu den Kontrollhepatocyten geringfügig veränderte Leberzelle eines weiblichen Tieres nach Belastung mit 100 µg/L DHEA. Der Kern ist unauffällig, mit sichtbarem Nucleolus. Das rauhe endoplasmatische Retikulum (rER) ist nicht mehr ausschließlich in Kernnähe zu finden, sondern über die gesamte Zelle verteilt. Das rER ist fenestriert und zum Teil auch fragmentiert. Zahlreiche Golgi-Felder sind zu erkennen. In den Zellen sind geringe Glykogenmengen und große Lipidtropfen zu finden. (Vergrößerung: 5100 ×). **b:** Leberzelle eines männlichen Tieres nach Belastung mit 100 µg/L DHEA. Dichte rER-Stapel sind entlang der Hepatocytenmembran angelegt. In den Zellen sind große Mengen an Glykogen zu erkennen (Vergrößerung: 5500 ×). **c:** Hepatocyte eines Ovotestis-tragenden Zebrabärblings. Der in seiner Form leicht veränderte Kern enthält einen deutlich ausgeprägten Nucleolus. Das stark fragmentierte rER ist über die gesamte Zelle verteilt. Mitochondrien sind zahlreich zwischen den rER-Zisternen zu erkennen. Golgi-Felder kommen in hoher Anzahl vor. Die Golgi-Zisternen sind stark dilatiert und von unterschiedlicher Elektronendichte, wie auch die sich an ihnen abschnürenden Vesikel. In der Nähe der Golgi-Felder sind Membranwirbel zu erkennen (Vergrößerung: 5700 ×). **d:** Im Vergleich zu den Kontrollhepatocyten stark veränderte Leberzelle eines weiblichen Tieres nach Belastung mit 100 µg/L DHEA. Der Kern enthält einen stark ausgeprägten Nucleolus. Das rER ist stark fragmentiert. Golgi-Felder sind in hoher Zahl zu sehen; die Golgi-Zisternen sind unterschiedlich elektronendicht. Lipidtropfen sind häufig zu sehen (Vergrößerung: 7500 ×).

Bildtafel 34: Hoden DHEA

Tabelle 3.4.4: Ultrastrukturelle Untersuchung der Leber von Zebrabärblingen nach kontinuierlicher Belastung mit DHEA ($\geq 100 \mu\text{g/L}$) im Life-Cycle-Test.

	Weibchen		Zwitter	Männchen	
	Kontrolle	DHEA	DHEA	Kontrolle	DHEA
Kern					
Unregelmäßige Kernumrisse	-	+	+++	-	-
Mitochondrien					
Menge	++	+++	+++	+	++
Heterogenität	+	++	+++	+	+
Assoziation mit ER	++	++	+	++	+
rER					
Menge	++++	++++	++++	+	+++
Fenestrierung der rER-Zisternen	-	+++	++++	-	++
Vesikulierung und/oder Fragmentierung	-	+	++	-	++
Verlust der Stapelbildung	-	++	+++	-	+
Bildung konzentrischer Membranwirbel	-	+	+++	-	++
Einlagerung von Lipid (Steatose)	-	-	-	-	+++
Golgi-Felder					
Z. T. sehr elektronendichte Zisternen	-	+	+++	-	+
Menge	++	+	++++	-	+++
Dilatation der Zisternen	-	-	+++	-	-
Erhöhte Vesikelbildung	+	++	++++	-	+++
Reservestoffe					
Lipidmenge	++	+++	+	+	++
Glykogenmenge	++	+	+	++++	++

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

Bildtafel 35: Hepatocyten von, mit $100 \mu\text{g/L}$ DHEA belasteten Zebrabärblingenmännchen. **a:** - **d:** Die Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulum sind stark dilatiert, in ihrem Lumen sind zahlreiche Lipidtröpfchen zu erkennen (Steatose; Vergrößerungen: **a:** $3400\times$, **b:** $8000\times$, **c:** $11200\times$, **d:** $8000\times$).

Bildtafel 35: Steatose

3.4.2.9 *Veränderungen der Skelettknochen und des Schädels nach Exposition gegenüber DHEA*

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 (Bildtafel 36, Bild a). 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 (Bild 36a).

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

Ähnlich wie bei den mit Nonylphenol belasteten Zebrabärblingen war auch hier nach Belastung mit $\geq 2\mu\text{g/L DHEA}$ eine Schädigung der Wirbelsäule zu beobachten. Bei vielen Tieren zeigten sich starke Krümmungen (Bildtafel 36, Bild d). Die Wirbelkörper wirkten deutlich dünner als die der unbelasteten Tiere (Bild 36d). Rippen-, Hämal- und Neuralbögen schienen verbogen und zum Teil gebrochen (Bild 36b, c). Entsprechend den Kontrolltieren, war die Aufgabelung der Wirbelsäule im Bereich der Schwanzflosse noch zu erkennen, anders als bei den mit Nonylphenol belasteten Zebrabärblingen (Bild 36 b, c, d).

Bildtafel 36: Skelette unbelasteter und mit unterschiedlichen DHEA-Konzentrationen behandelter Zebrabärblinge. **a:** Skelett eines Kontrolltieres. Die Wirbelsäule ist gerade und die einzelnen Wirbelkörper sind deutlich gegeneinander abgesetzt. 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 $100\mu\text{g/L DHEA}$ behandelten Zebrabärblings. Die Wirbelkörper sind deutlich dünner als die der Kontrolltiere und erscheinen in ihrem Aufbau nicht mehr so deutlich gegliedert (\rightarrow). Die Aufgliederung der Wirbelsäule im Schwanzbereich ist erkennbar. **c:** Skelett eines Zebrabärblings der über das gesamte Leben mit $20\mu\text{g/L DHEA}$ behandelt wurde. Die Wirbelsäule ist weitgehend gerade (\rightarrow). Hämal- und Neuralbögen sind gekrümmt und nicht mehr deutlich nach caudal gerichtet. **d:** Skelett eines Zebrabärblings der über das gesamte Leben mit $100\mu\text{g/L DHEA}$ behandelt wurde. Die Wirbelsäule weist mehrere Biegungen auf (\rightarrow). Die dünnen Wirbelkörper (\blacktriangleright) sind nicht mehr gegeneinander abgegrenzt sondern erscheinen verwachsen und sehr dünn. Vergrößerungen (a, b, c und d): $3\times$.

Bildtafel 36: Skelette

3.4.3 Diskussion der Wirkung von DHEA auf den Zebraabärbling

Im Gegensatz zu den beiden anderen Life-Cycle-Versuchen, in denen mit den Alkylphenolen Substanzen getestet wurden, deren Umweltpersistenz bereits in zahlreichen Studien belegt werden konnte, kann für DHEA eine mögliche Umweltrelevanz bislang nur vermutet werden. DHEA spielt eine große Rolle bei vielen physiologischen Reaktionen des Körpers, beispielsweise bei der Immunabwehr und als Baustein zahlreicher Hormone wie der Geschlechtshormone (Zwain et al., 1999). Viele Krankheiten wie Fettsucht, Diabetes, Bluthochdruck, Krebs, einige Immunschwäche-Erkrankungen, Erkrankungen der Koronargefäße und Autoimmunerkrankungen können mit einem DHEA-Mangel korreliert werden (Zumoff et al., 1981; Nestler et al., 1988; Schriock et al., 1988; Stahl et al., 1992; Casson et al., 1993; Labrie et al., 1998). Hierin und in der Stimmungs-beeinflussenden Wirkung von DHEA liegt der Grund für den hohen Konsum dieses Stoffes hauptsächlich in den USA. Vor allem auch durch den Einsatz von DHEA in der Hormontherapie bei Frauen (Labrie et al., 1998) ist eine Ausscheidung von DHEA über den Urin denkbar (Dehennin et al., 1998), wie sie in ähnlicher Weise auch für die synthetischen Estrogene der Anti-Babypille beschrieben wurde (Sumpter et al., 1996). Auch wenn dieser Weg in die Umwelt nur angenommen werden kann, erschien es sinnvoll, die Wirkung des bei Säugetieren als inaktive Vorstufe von Estradiol und Testosteron nachgewiesenen DHEA (Zwain et al., 1999) an Fischen zu testen. Die Ergebnisse des Life-Cycle-Versuchs deuten zum Teil in ähnlicher Weise wie für die zuvor mit den Alkylphenolen durchgeführten Experimente auf eine Beeinflussung des Hormonsystems hin. Viele der gezeigten Effekte wie die Hodenstrukturveränderungen, die in die Hoden eingestreuten Oocyten und das Auftreten von Atresie konnten bereits nach Exposition gegenüber Nonylphenol und Octylphenol beschrieben werden und wurden bei diesen Versuchen diskutiert. Neben den erwähnten histologischen Veränderungen zeigten sich nach Exposition gegenüber 100 µg/L DHEA bei 14 % der Tiere und damit 70 % der makroskopisch als Männchen bestimmten Individuen Mischgonaden, wie sie bislang nicht dokumentiert werden konnten. Das Auftreten der Ovotestes war eng mit dem vollständigen und irreversiblen Erliegen der Reproduktionsfähigkeit korreliert.

Mischgonaden sind aus der Literatur vor allem im Zuge der natürlichen Geschlechterumkehr bei hermaphroditen Fischarten bekannt (Chan und Yeung, 1983). Sie können aber auch durch die Gabe von Steroiden sowohl bei hermaphroditen (Chang et al., 1995; 1998) als auch bei gonochoristischen Fischarten (Blázquez et al., 1998) induziert werden. Aus Freilandstudien kennt man das Vorkommen von Ovotestes mit einer Häufigkeit von bis zu 100 % ausgelöst durch Steroid- bzw. Xenoestrogen-Kontamination beispielsweise bei Plötzen (*Rutilus rutilus*; Purdom et al., 1994; Jobling et al., 1998; Routledge et al., 1998) und Flundern (*Platichthys flesus*; Matthiessen et al., 1998; Allen et al., 1999).

Das bei den Zebraabärblingen beschriebene Auftreten von Ovotestes kann als Hinweis auf eine hormonelle Einflussnahme durch DHEA gewertet werden. Vor allem während der Juveni-

lentwicklung, in der die männlichen Zebrabärblinge nach einem nicht funktionellen „Weibchenstadium“ eine intersexuelle Phase durchlaufen (Chan und Yeung, 1983), könnte diese Beeinflussung zum Tragen gekommen sein.

Dass die angenommene Störung des Hormonmetabolismus auf eine mögliche estrogene Wirkung von DHEA zurückzuführen ist, kann allerdings nicht allein durch das Auftreten der Intersexgonaden erklärt werden. Auf eine estrogene Wirkung DHEAs deutet vor allem der erhöhte Anteil weiblicher Tiere im Vergleich zu den Kontrollen ab einer Belastung mit 2 µg/L DHEA hin. Zwar ist es erstaunlich, dass es weder zu einem 100 %igen Vorkommen von Mischgonaden, noch zu einer kompletten Verschiebung des Geschlechterverhältnisses gekommen ist, doch korrelieren gerade diese Beobachtungen mit einer von Blázquez et al. (1998) durchgeführten Untersuchung an Seebarschen (*Dicentrarchus labrax*). Die Autoren beschreiben an dieser ebenfalls zu den Gonochoristen gehörenden Fischart nach 17β-Estradiol-Exposition das Auftreten von Mischgonaden bei 57 % der Fische. 17 % der übrigen Tiere blieben trotz des Hormoneinflusses Männchen.

Aber nicht allein die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses innerhalb der Zebrabärblingspopulation vor allem nach Exposition gegenüber 100 µg/L DHEA kann als estrogener Effekt gewertet werden. Auch das völlige Ausbleiben des Reproduktionserfolges bei den gegenüber 100 µg/L DHEA exponierten Zebrabärblingen läßt sich mit Befunden aus anderen Studien korrelieren, in denen nach Estradiol-Behandlung von Fischen signifikant verringerte Eizahlen dokumentiert werden konnten (Shioda und Wakabayashi, 2000), und als estrogene Beeinflussung einstufen. Zwar sind bei den Reproduktionsversuchen sicherlich auch solche Tiere eingesetzt worden, die makroskopisch maskulin erschienen, in Wirklichkeit aber Zwitter waren. Da aber alle männlich aussehenden Fische mehrfach getestet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass auch die „echten“ Männchen nicht mehr zur Reproduktion fähig waren. Sterilität, infolge einer Exposition gegenüber Steroiden wie Ethynylestradiol ist auch in an einer Reihe von Studien vor allem nach Langzeitexposition von Fischen beschrieben (Schreck, 1974; Hunter und Donaldson, 1983; Padian und Sheela, 1995; Blázquez et al., 1998), und konnte in der vorliegenden Dissertation bereits nach Nonylphenol-Behandlung gezeigt werden.

Im Unterschied zu dem mit Nonylphenol durchgeführten Versuch war nach lebenslanger Exposition gegenüber 100 µg/L DHEA ein Einbruch der Reproduktionsfähigkeit nicht nur bei den männlichen, sondern auch bei den weiblichen Tieren zu beobachten. Worauf die Sterilität der Zebrabärblinge nach DHEA-Behandlung beruhte, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Eine Änderung des Verhaltens, wie sie nach Nonylphenol-Exposition als mögliche Ursache angenommen wurden, ist jedoch auszuschließen.

Auch wenn man den Wirkmechanismus von DHEA innerhalb der Fische noch nicht kennt, können zwei mögliche Wege der Beeinflussung des Hormonsystems in Betracht gezogen werden. Einerseits könnte es zu einer Metabolisierung von DHEA über die Bildung von

Testosteron (s. Abb. 3.4.6) zu Estrogen gekommen sein. Somit lassen sich die an den Zebraabräblingen beobachteten Veränderungen mit den durch Estradiol ausgelösten vergleichen.

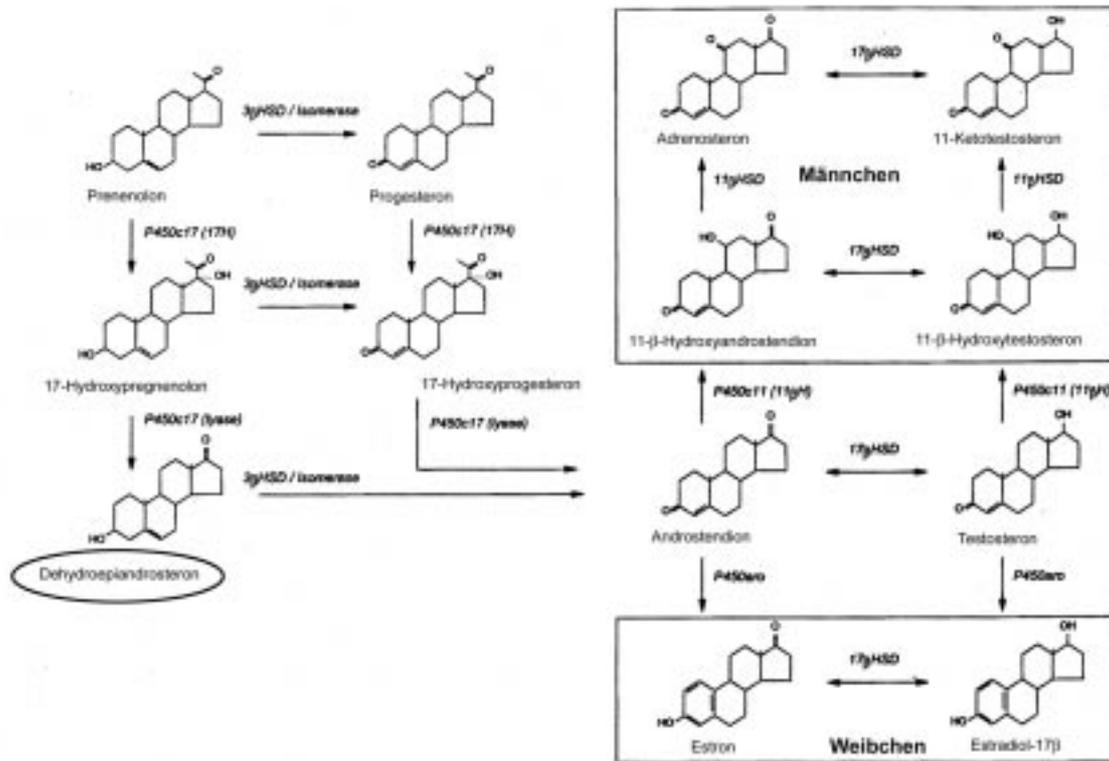


Abbildung 3.4.6: Schematische Darstellung einiger gonodaler Steroid-Stoffwechselwege, dargestellt nach *In vitro*-Untersuchungen an Regenbogenforelle und Tilapia. Abkürzungen der Enzyme: P450_{aro} = Aromatase; P450c11 (11 β H) = 11 β -Hydroxylase; P450c17 (17H) = 17-Hydroxylase; P450c17 (lyase) = 17,20-Lyase; HSD = Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Graphik modifiziert nach Baroiller et al., 1999).

Die exogene Gabe von Estradiol führt bei adulten Ratten beispielsweise zu einer Störung der Spermio-genese und einer verminderten Spermienabgabe, entweder über die Unterdrückung der Gonadotropinsynthese und daraus resultierend der Hemmung der Androgenausschüttung (Sharpe, 1994) oder über eine direkte Hemmung der intratestikulären Androgenbildung (Dufau, 1988; Nishihara, 1988; Sharpe, 1994). Ähnliche Effekte sind auch bei Fröschen (Fasano et al., 1989; Pierantoni et al., 1986) und Fischen (Billard et al., 1981; Malison et al., 1986; Shibata und Hamaguchi, 1988; Trudeau et al., 1991, 1993) beschrieben, und im Hinblick auf diese Mechanismen lassen sich einige der in der Umwelt auftretenden Veränderungen der Reproduktionsorgane erklären (Donaldson und Scherer, 1983; Pelissero et al., 1993; Purdom et al., 1994; Sumpter et al., 1996; Jobling et al., 1996). Für die Zebraabräblinge bedeutet dies, dass die beschriebene Sterilität auch durch ein eventuelles Überangebot an Estradiol ausgelöst worden sein könnte. Hierdurch könnte es dann wie bei den Ratten entweder zu einer direkten

Hemmung der Gonadotropinausschüttung oder zu einer direkten Beeinflussung der intratestikulären Androgenbildung gekommen sein.

DHEA könnte auch ohne vorherige Metabolisierung über eine Estrogenrezeptor-vermittelte Reaktion gewirkt haben, wie in einer *In vitro*-Studie an Säugerzellen gezeigt wurde (Bruder et al., 1997). In dieser Untersuchung konnte eine Stimulation der über den Estrogenrezeptor ausgelösten estrogenabhängigen Antworten durch DHEA gezeigt werden, ohne dass dies vorher in die Steroide metabolisiert werden musste.

Bei allen diskutierten Effekten bleibt die Frage, warum DHEA in den Zebrabärblingen eine estrogene Wirkung gezeigt hat, obwohl es in einer Reihe älterer Arbeiten an Fischen als androgen wirksame Substanz (Chan und Yeung, 1983) bzw. als Vorläufer der Androgene (Foster et al., 1983) bezeichnet wird. So beschreibt beispielsweise Yamamoto (1969) die Induktion von 50 % XX-chromosomalen Männchen bei Medakas nach Gabe von DHEA >3,2 mg/g Futter. Ein möglicher Grund für die bei den Zebrabärblingen dokumentierte Verweiblichung der Population könnte in der Aktivität der Aromatase zu suchen sein, wenn man davon ausgeht, dass DHEA tatsächlich in 17 β -Estradiol umgebaut worden ist. Da der Zebrabärbling wie bereits erwähnt eine weibliche Phase während seiner Entwicklung durchläuft, könnte das dadurch entstehende Hormonmilieu einen solchen Prozeß begünstigt haben. Selbst wenn DHEA nicht vollständig zu 17 β -Estradiol metabolisiert worden ist, d. h. eventuell Testosteron als Zwischenstufe entstanden ist, ist nicht unbedingt mit einer Vermännlichung zu rechnen, da in Fischen 11-Ketotestosteron das eigentlich wirksame Geschlechtshormon ist (Kime, 1993). Testosteron kommt normalerweise sogar bei Weibchen in höheren Konzentrationen vor als bei Männchen (Campbell et al., 1976; 1980; Stuart-Kregor et al., 1981; Scott et al., 1980a, b) und zeigt bei einigen Fischarten einen Peak am Ende der Vitellogenese (Campbell et al., 1976; Wingfield und Grimm, 1977; Scott et al., 1980b).

Nicht allein nach lichtmikroskopischer Auswertung der Gonaden DHEA-belasteter Versuchstiere, auch nach ultrastruktureller Betrachtung der Hepatocyten der gegenüber 100 μ g/L DHEA exponierten Zebrabärblinge waren weitreichende Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren erkennbar. Der auffälligste durch DHEA induzierte Effekt war die Akkumulation mikrovesikulärer Lipidtropfen in den rER-Zisternen. Dieser als membrangebundene Steatose bezeichnete Effekt tritt nach Phillips et al. (1987) bei Säugetieren häufig auf und kann beispielsweise durch Glucocorticoide, Acetaminophen, Methotrexat, L-Asparaginase, Antibiotika, Colchicin, Ethionin, Insektenrepellents und Pestizide ausgelöst werden. Bei Zebrabärblingen konnte Steatose nach γ -Hexachlorocyclohexan-Exposition nachgewiesen werden (Braunbeck et al., 1990a).

In der Säugetierliteratur werden die Lipidtropfen innerhalb des rER auch als Liposomen bezeichnet (Baglio und Farber, 1965). Ausgelöst wird die Bildung dieser Liposomen nach Meinung von Baglio und Farber (1965) durch die Hemmung der Metabolisierung von Leber-Triglyceriden infolge einer defekten Synthese von VLDL (very low density lipoproteins) oder

die Störung der Proteinsynthese (De la Iglesia et al., 1982; Plaa, 1986). VLDL sind in den Transport von Triglyceriden zu den extrahepatischen Geweben über das Blut involviert (Plaa, 1986). Für eine Beeinflussung des Triglycerid-Metabolismus bei den gegenüber 100 µg/L DHEA exponierten Zebrabärblingen spricht auch eine Studie von Diamond et al. (1996). In dieser Untersuchung konnte nach 12-monatiger DHEA-Gabe bei Frauen eine Abnahme sowohl der Triglyceride, als auch der Lipoproteine und Cholesterol im Plasma beschrieben werden (Diamond et al., 1996).

Betrachtet man das Gesamtbild der Effekte, die an den Zebrabärblingen nach DHEA-Exposition gezeigt werden konnten, kann auf jedem Fall von einer hormonellen, wahrscheinlich estrogenen Beeinflussung durch diesen Steroidvorläufer ausgegangen werden. Als Anzeichen für eine mögliche toxische Wirkung von DHEA können, ähnlich wie nach Nonylphenol- und Octylphenol-Behandlung der Zebrabärblinge in den ersten beiden Life-Cycle-Experimenten, eventuell die Schädigungen und erhöhten Mortalitäten der Larven der F₁- und F₂-Generation nach DHEA-Belastung gewertet werden.