

4 Zusammenführung der Befunde

In der vorliegenden Arbeit gelang es, neben der Bereitstellung einer neuen Methode zum Nachweis des Biomarkers Vitellogenin ein komplexes Bild über die Wirkungsweise estrogen aktiver Substanzen beim Zebraquariabläuling aufzuzeigen. Durch die lebenslange Exposition der Zebraquariabläulinge konnten Daten erhoben werden, die eine Beurteilung der getesteten Chemikalien auf verschiedenen Ebenen biologischer Organisationen zuließen. Neben Veränderungen auf zellulärer Ebene zeigten sich Beeinträchtigungen der Individuen im Sinne von veränderten Organstrukturen und funktionellen Prozessen wie Eizahlen und Befruchtungsraten. Auch die Frage nach einer möglichen Beeinflussung auf Ebene der Population konnte durch das gewählte Versuchsdesign des kompletten Life-Cycle-Experimentes und die erhobenen Parameter beantwortet werden. Da die Population nach dem Ökosystem die zweithöchste Organisationsebene darstellt, bieten die erhaltenen Daten eine bessere Grundlage bei der Bewertung des Einflusses der getesteten Chemikalien auf das Freiland als die in vielen Studien untersuchten Biomarker, die meist nur auf den unteren Ebenen des Organisationsniveaus ansetzen (Braunbeck et al., 1995).

Zwar sind solche Biomarker hilfreich bei der ersten Einschätzung des endokrinen Potentials einer Substanz, doch ist es unmöglich, von molekularer bzw. Organell- und Zellebene auf gesamte Populationen oder das Ökosystem zu schließen. Aber gerade der Schutz der Populationen und Ökosysteme ist das Hauptziel der Ökotoxikologie. Daher zeichnet sich auch in der Forschung der letzten Jahre eine deutliche Tendenz von den akuten Toxizitätstests zu subchronischen und chronischen Untersuchungen hin ab (Patyna et al., 1999). Nachteil bei der Durchführung solcher Tests ist der enorme Zeit- und Kostenaufwand (Braunbeck, 1995). Dennoch konnte durch die vorliegende Dissertation die Notwendigkeit der Durchführung von Life-Cycle-Experimenten insbesondere für die Bewertung endokriner Wirkmechanismen gezeigt werden. Als Argumente für den Life-Cycle-Test haben sich in diesem Zusammenhang die folgenden Gesichtspunkte erwiesen:

- Veränderungen, die auf eine estrogenische Beeinflussung der Schadstoffe hinwiesen, zeigten sich meist erst nach Erreichen der adulten Lebensphase.
- Während der Embryonal- und Larvalphase auftretende Schädigungen wie Ödeme und Augenanomalien können durch die estrogenische Wirkung eines Stoffes verursacht worden sein. Da solche Veränderungen aber als unspezifische Schadstoffeffekte anzusehen sind, können sie nicht als Marker für das estrogenische Potential eines Stoffes gewertet werden. Vielmehr könnten sie auch durch eine mögliche Toxizität des getesteten Stoffes bedingt werden, da gerade die frühen Lebensstadien als die sensibelsten angesehen werden (Pikering und Gast, 1972; McKim et al., 1975; McKim, 1977; Van Leeuwen et al., 1985; Suter et al., 1987; Peterson et al., 1993; Samson und Shenker, 2000; Villalobos et al., 2000). Als Konsequenz daraus reicht für die Bewertung des estrogenen Potentials einer

Substanz der Early-Life-Stage-Test, der sich bei der Untersuchung der Toxizität als wertvolles Werkzeug erwiesen hat, nicht aus.

- Durch die Exposition der Fische über den gesamten Lebenszyklus können alle sensitiven Fenster ohne genaue Kenntnis der relevanten Zeitpunkte abgedeckt werden.
- Hormonelle Veränderungen sind teilweise bereits makroskopisch durch die veränderte Ausprägung sekundärer Geschlechtsmerkmale und Verhaltensänderungen sichtbar.
- Reproduktionsbiologische Untersuchungen können ein zuverlässiges Bild über den Zustand der Population zeichnen, und Kreuzexperimente machen die Bewertung der geschlechtsspezifischen Beeinflussung möglich.
- Auch zunächst nicht offensichtlich zu einer Bedrohung der Population führende Effekte wie die Veränderung von Morphologie (Skelettanomalien) und Konditionsfaktoren können berücksichtigt und bewertet werden. Solche Veränderungen können gerade für natürliche Populationen von großer Bedeutung sein (Elliott, 1990; Ashfield et al., 1998).
- Durch die lebenslange Exposition wird der Faktor der Akkumulation eines Schadstoffes berücksichtigt. Dieser Aspekt ist gerade bei der Untersuchung lipophiler Chemikalien wie die in der vorliegenden Studie untersuchten nicht außer Acht zu lassen.
- Durch die lebenslange Exposition einer Generation lassen sich Auswirkungen auf die Folgegeneration untersuchen. Auch hier kann die Akkumulation eines Schadstoffes von Bedeutung sein, da lipophile Substanzen über den Dotter an die Embryonen weitergegeben werden können (Helder, 1980; Van Leeuwen et al., 1985; Bern und Nishioka, 1993).

In der vorliegenden Dissertation konnte die Leber als Monitororgan für die estrogenen Wirkung einer Substanz bestätigt werden. Einerseits war eine schnelle und sensitive Reaktion des Organs auf estrogenen Stimuli auf molekularem Organisationsniveau an Regenbogenforellen darstellbar: Bereits 3 Tage nach Estradiolinjektion war Vitellogenin immunhistochemisch in männlichen und weiblichen Tieren nachweisbar. Andererseits zeigte sich der Einfluss lebenslanger Estrogen-, Nonylphenol- und Octylphenolbehandlung in umweltrelevanten Konzentrationen (2 µg/L) auf der Ebene der Organellen und Zellen von Zebrafischen. Als korrelierender Effekt aller Life-Cycle-Experimente ist die Proliferation des Proteinsyntheseapparates zu nennen, zumindest teilweise beruhend auf einer erhöhten Vitellogeninsyntheserate (Ng et al., 1984) bzw. einer *De novo*-Induktion der Vitellogeninsynthese bei den männlichen Tieren.

Neben dem reinen Nachweis der estrogenen Aktivität sollten durch die Durchführung der Life-Cycle-Experimente vor allem mögliche Folgen für die Population untersucht werden. Eine besondere Gewichtung lag daher auf der Untersuchung der Reproduktionsfähigkeit, dem Reproduktionserfolg und der Morphologie der Reproduktionsorgane. In allen drei Life-Cycle-Versuchen fielen starke dosisabhängige Veränderungen aller Parameter auf, die meist untereinander korreliert werden konnten und die auf eine hormonelle Beeinflussung der Versuchstiere hindeuten. Nach dem Vergleich der Befunde mit den in der Literatur beschriebenen Effekten muss von einer Beeinflussung der Gonadotropin-Synthese, wahrscheinlich über den

negativen Feedback-Mechanismus auf Hypophyse oder Hypothalamus ausgegangen werden. Im Folgenden sind die funktionellen und morphologischen Veränderungen des Reproduktionssystems dargestellt, die nach Exposition von Nonylphenol, Octylphenol und DHEA dokumentiert werden konnten (siehe auch Abb. 4.1):

- undeutliche Ausprägung, bis vollständiges Fehlen sekundärer Geschlechtsmerkmale (vor allem nach DHEA-Exposition),
- verändertes Reproduktionsverhalten (nur nach Exposition gegenüber 100 µg/L Nonylphenol),
- Rückgang von Eizahlen und Befruchtungsraten,
- Auftreten „unreifer“ Hoden, ausgelöst wahrscheinlich durch die Blockade der Spermatogenese,
- Auftreten parall mit Spermien angefüllter Hoden, zum Teil parallel mit der Erscheinung „unreifer“ Hoden bei anderen Versuchstieren exponiert gegenüber der gleichen Schadstoffart und -konzentration,
- Auftreten „unreifer“ Ovarien, in denen ausschließlich Oocyten der ersten Reifestufe nachgewiesen werden konnten.
- erhöhte Atresierate in dosisabhängiger Weise, bis hin zur kompletten Desintegration des Ovars,
- Fehlen reifer Oocyten innerhalb eines sonst normal entwickelten Ovars,
- Bildung von Ovotestes,
- Beeinträchtigungen der F₂-Generation im Fall der Alkylphenole, bedingt wahrscheinlich durch die Weitergabe der lipophilen Substanzen über den Dotter.

Zusätzlich zu den an Individuen beobachteten Veränderungen, die zu einer Gefährdung für den Fortbestand einer Population führen können, konnten in allen Life-Cycle-Experimenten auch direkte Veränderungen der Populationsstruktur beobachtet werden: Die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zu Gunsten der Weibchen ist mit Sicherheit als bedrohlichster Faktor für die Population zu werten.

Die Life-Cycle-Experimente boten die Möglichkeit, auch solche Effekte zu untersuchen, die nicht direkt auf eine estrogenen Beeinflussung des Schadstoffes hindeuten und daher auch durch toxische Wirkmechanismen erklärbar sind. Da aber diese Veränderungen auch zu einer Bedrohung der Population führen können, die zunächst vielleicht nicht augenscheinlich ist, sind sie nicht zu vernachlässigen und bestätigen einmal mehr die Notwendigkeit der Durchführung von Life-Cycle-Experimenten. Parameter, die eine Beeinflussung der Tiere des Life-Cycle-Versuchs andeuteten, die wahrscheinlich auf estrogenen Mechanismen, möglicherweise aber auch durch die Toxizität der getesteten Stoffe ausgelöst worden sein können waren:

- Störungen der Embryonal- und Larvalentwicklungen wie das verzögerte Schlüpfen der Larven, Mißbildungen der Larven in Form von Ödemen, Augenanomalien und Wirbelsäulenverkrümmungen, verlangsamte Entwicklungsgeschwindigkeit und erhöhte Mortalität,
- veränderte Anatomie adulter Tiere, besonders deutlich makroskopisch nach Exposition gegenüber 100 µg/L Nonylphenol; nach Untersuchung der skelettalen Elemente auch nach Exposition ab 2 µg/L gegenüber DHEA und Octylphenol erkennbar,
- veränderte Konditionsfaktoren, wobei ein deutlicher Trend zur Zu- oder Abnahme des Gewichtes und der Größe nicht gezeigt werden konnte (diese Beobachtungen korrelieren mit anderen Studien, in denen unspezifische Gewichtsveränderungen beschrieben sind, (Johnstone et al., 1978; Ashfield et al., 1998; Blázquez et al., 1998; Åkerblom et al., 2000).

Wie in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden konnte, haben sich die Life-Cycle-Versuche für die Klärung des estrogenen Potentials eines Stoffes als notwendig erwiesen. Denn weder in den ebenfalls durchgeführten Early-Life-Stage-Untersuchungen mit Nonylphenol und Octylphenol, noch durch die Untersuchung von Biomarkern wie die Induktion der Vitellogeninsynthese wie sie ausgelöst durch die beiden Alkylphenole, bereits mehrfach beschrieben werden konnte (Lech et al., 1996; Christiansen et al., 1998a; Christensen et al., 1999; Gronen et al., 1999; Thibaut et al., 1999; Toomey et al., 1999; Yadetie et al., 1999, Kinnberg et al., 2000), konnten Aussagen über eine reproduktionsbiologische oder konditionelle Beeinflussung der Tiere, oder über eine mögliche Veränderung der Populationsstruktur getroffen werden. Aber gerade solche Aspekte sind im Freiland von ausschlaggebender Bedeutung für das Überleben einer Population.

Auch wenn bei den vorgestellten Life-Cycle-Versuchen nach Exposition gegenüber umweltrelevanten Konzentrationen keine Beeinträchtigungen dokumentiert werden konnten, die eine unmittelbare Gefährdung der Population andeuteten, waren doch bereits tendenzielle bis signifikante Unterschiede beispielsweise bei Eizahlen und Befruchtungsraten Nonylphenol- und Octylphenol-belasteter Zebraquärlinge zu erkennen. Auch bei den Early-Life-Stage-Versuchen, die mit aus der belasteten Generation hervorgegangenen Folgegeneration durchgeführt wurden, deuteten sich Schädigungen an.

Ausblicke

Aus Kostengründen ist die routinemäßige Durchführung von Life-Cycle-Experimenten problematisch. Daher beruht die derzeitige Forschung noch immer vorwiegend auf der Entwicklung von molekularen Biomarkern. Die Ergebnisse aus den Biomarker-Versuchen sind aber nur bedingt auf Ökosystem, Biozönose und Tierpopulationen übertragbar. Daher erhält der Life-Cycle-Versuch starke Bedeutung bei der Bewertung solcher Substanzen, die in den grundlegenden Biomarkerstudien nur schwaches endokrines Potential aufweisen.

Eine Vereinfachung der Life-Cycle Versuche wäre durch das genaue Studium der Entwicklung der Versuchstiere möglich. Bekannterweise gibt es in der Entwicklung von Fischen einzelne Stadien, in denen gravierende physiologische Veränderungen stattfinden (saltatorische Entwicklung). Davon betroffen ist auch die Festlegung des Geschlechtes. Durch die genaue Kenntnis dieser entwicklungsphysiologisch relevanten Zeitpunkte wäre eine Verkürzung der Life-Cycle-Versuche möglich, wodurch ein Großteil der Kosten eingespart werden könnte.

Zusammen mit molekularbiologischen, histologischen und morphologischen Untersuchungen kann der Life-Cycle-Versuch dann in ein vollständiges Testsystem integriert werden. Ein besonderer Schwerpunkt muss hierbei auf die Durchführung von Multigenerationstests gelegt werden. Die vorliegende Dissertation gibt Hinweise darauf, dass gerade lipophile Stoffe wie die Alkylphenole, zu einer Beeinträchtigung belasteter Elterntiere führen können.