

INAUGURAL DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

Vorgelegt von

Diplom-Biologin Susanne Barbara Marie Knörr

aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung.....13.2.2001

Ökotoxikologische Untersuchungen zur Wirksamkeit endokrin aktiver
Substanzen auf Fische

Gutachter: **HD Dr. Thomas Braunbeck**
Zoologisches Institut I, Universität Heidelberg

Prof. Dr. Werner Herth
Institut für Zellbiologie, Universität Heidelberg

„We´ve been spoiling the environment just dreadfully and thinking we were fine, because we were using the techniques of science. Then it turns to technology, and it´s slapping us back because we did not think it through. We were making assumptions, we had no right to make.... We´re not thinking it through, just spewing it out.....“

Barbara McClintock in: Keller 1983

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut I der Universität Heidelberg im Zeitraum von 1996 bis 2000 erstellt und vom Umweltbundesamt unter der Projektnummer 21602001/01 sowie vom Bayerischen Landesministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen innerhalb des Forschungsvorhabens 73e040100 gefördert.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen beigetragen, mein besonderer Dank gilt deshalb:

Herrn HD Dr. Thomas Braunbeck für sein in mich gesetztes Vertrauen, seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für die Betreuung dieser Dissertation,

Herrn Prof. Dr. Werner Herth für die Übernahme des Korreferats

Herrn Dr. Rolf Dieter Negele und Frau Dr. Julia Schwaiger für die Möglichkeit am Forschungsvorhaben des Bayerischen Staatsministeriums teilzunehmen,

Der gesamten Arbeitsgruppe für das gute Arbeitsklima und die allgemeine Hilfsbereitschaft, namentlich:

Markus Islinger für die Herstellung des Regenbogenforellen-Antikörpers und die Isolation des Forel-lenvitellogenins, aber vor allem für seine Hilfe in allen Labor- und Fachfragen und seine Freundschaft,

Ute Bieberstein für die gute Zusammenarbeit bei der Wartung der Anlage für die Life Cycle-Experimente und ihr geduldiges Korrekturlesen in der Endphase dieser Arbeit,

Daniel Willimski für seine Hilfe bei den Vitellogeninmessungen,

Thorsten Uhde für das stundenlange und unermüdliche Korrekturlesen,

Sascha Pawlowski, Thomas Berbner, Jens Konradt, Bernhard Wetterauer, Anne Sagner und allen anderen aus der Arbeitsgruppe, ohne die die Arbeit sicher weniger Spaß gemacht hätte,

Erik Leist für die Hilfe bei der Fischzucht und allen Arbeiten an den Aquarienanlagen,

Frau Gisela Adam für ihre Hilfe und Mühe bei der Erstellung der Bildtafeln,

Frau Claudia Kempendorf und Frau Renate Mummert für Hilfe im Labor,

Marija Strmac für das geduldige Korrekturlesen und ihre Freundschaft,

Carsten für seine Freundschaft und Unterstützung,

meiner Cousine Ike Alan Haube für die große Mühe bei den „Literaturbesorgungen“ an der Münchner Staatsbibliothek,

meinem Bruder Wolfram für seine Hilfe in Computerangelegenheiten und die vielen Liter Kaffee sowie die vielen Sicherungs-CD-ROM, die er mir gebrannt hat,

und meinen Eltern, die mir das Biologiestudium ermöglicht haben.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Endokrine Disruptoren: Eine Bedrohung für Tier und Mensch?	1
1.2 Substanzen mit endokriner Wirksamkeit	2
1.3 Mechanismen endokriner Wirksamkeit	5
1.4 Organisationsebenen	5
1.5 Testsysteme.....	7
1.6 Ziele dieser Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	11
2.1 Testorganismen	11
2.1.1 Die Regenbogenforelle <i>Oncorhynchus mykiss</i>	12
2.1.2 Der Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	12
2.1.3 Der Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	12
2.2 Exposition juveniler Karpfen gegenüber Nonylphenol- und Abwasser der Kläranlage München Nord (Großlappen)	13
2.2 Exposition adulter Regenbogenforellen gegenüber Nonylphenol	13
2.4 Exposition juvenilen Regenbogenforellen gegenüber Nonylphenol	14
2.5 Exposition adulter Regenbogenforellen gegenüber der Ringkanalisation Starnberger See	14
2.6 Life Cycle-Experimente mit dem Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	14
2.6.1 Verwendete Testsubstanzen in den Life-Cycle Experimenten	15
2.6.2 Versuchsaufbau und Tierhaltung bei Belastung mit Nonylphenol	15
2.6.3 Versuchsaufbau und Tierhaltung bei Belastung mit Octylphenol bzw. DHEA	19
2.7 Elektronenmikroskopie	20
2.8. Vitellogeninmessung im Plasma mit Hilfe eines kompetitiven ELISA	21
2.8.1 Aufreinigung des Vitellogenins aus der Regenbogenforelle	21
2.8.2 Antikörper gegen Regenbogenforellen-Vitellogenin	21
2.8.3 Plasmagewinnung	22
2.8.4 Reagenzien und Lösungen	22
2.1.1 Arbeitsprotokoll kompetitiver ELISA	22
2.9 Western Blot.....	23
2.10 Messung der Vitellogenin-mRNA-Induktion mit RT-PCR.....	24
2.10.1 RNA-Isolation.....	24
2.10.2 Semiquantitative RT-PCR der M-Vg0.5	25
3. Auswirkungen einer Belastung von Regenbogenforellen (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) mit Nonylphenol während der Juvenilzeit und Laichreife	27
3.1 Einleitung	27
3.2 Messung des Plasma-Vitellogenin-Gehalts adulter Forellen während der Laichreife nach Exposition gegenüber Nonylphenol.....	28
3.3 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber adulter Regenbogenforellen nach intermittierender Belastung mit Nonylphenol.....	30
3.4 Induktion der Vitellogeninsynthese in juvenilen Regenbogenforellen nach permanenter Belastung mit 4-Nonylphenol.....	46
3.5 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber juvenilen Regenbogenforellen nach permanenter Belastung mit 4-Nonylphenol.....	47
3.6 Diskussion	58

4. Untersuchung verschiedener Kläranlagenabläufe auf endokrine Wirkung	63
4.1 Einleitung.....	63
4.2 Messung des Vitellogeningehalts im Blutplasma adulter männlicher Regenbogenforellen nach Belastung mit dem Auslauf der Kläranlage Starnberg.....	65
4.3 Effekte von Nonylphenol und nonylphenolhaltigen Abwässern auf juvenile Karpfen.....	67
4.3.1 Plasma-Vitellogenin-Gehalt juveniler Karpfen nach Exposition gegenüber Nonylphenol bzw. nonylphenolhaltigen Abwässern.....	67
4.3.2 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber juveniler Karpfen nach Belastung mit Nonylphenol bzw. nonylphenolhaltigem Abwasser.....	69
4.4 Diskussion.....	82
5. Untersuchungen zur Wirkung von Nonylphenol auf den Medaka im Life Cycle-Experiment	85
5.1 Einleitung.....	85
5.2 Wirkung von Nonylphenol auf Entwicklung, Reproduktion, Geschlechterverhältnis und Leberultrastruktur des Medakas.....	86
5.2.1 Akute Toxizität (LC ₅₀ Test).....	86
5.2.2 Chemische Analysedaten.....	86
5.2.3 Wachstum der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	86
5.2.4 Entwicklung und Reproduktionserfolg der F ₁ -und F ₂ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol bzw. Estradiol.....	87
5.2.5 Befruchtungserfolg der F ₁ - und F ₂ -Generation und Entwicklung der F ₂ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung der F ₁ -Generation mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	91
5.2.6 Gelegegröße in der F ₁ -und F ₂ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung 4-Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	92
5.2.7 Geschlechterverhältnis der F ₁ - und F ₂ -Generation des Medakas nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit 4-Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	93
5.2.8 Reproduktionserfolg der F ₂ -Generation: Effekte von 4-Nonylphenol auf die Entwicklung in der F ₃ -Generation.....	95
5.2.9 Induktion der Vitellogenin-mRNA des Medakas (<i>Oryzias latipes</i>) nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit 4-Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	96
5.2.10 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber des Medakas nach lebenslanger Exposition gegenüber Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	96
5.3 Diskussion.....	110
6. Untersuchungen zur Wirkung von Octylphenol auf die Entwicklung und Reproduktion des Medakas im Life Cycle-Experiment	113
6.1 Einleitung.....	113
6.2 Wirkung von Octylphenol auf Entwicklung, Reproduktion, Geschlechterverhältnis und Leberultrastruktur des Medakas.....	114
6.2.1 Schlüpferfolg und Sterblichkeit in der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	114
6.2.2 Wachstum der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	118
6.2.3 Geschlechterverhältnis der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	119
6.2.4 Histologische Veränderungen in den Gonaden der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	120
6.2.5 Reproduktionserfolg der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol.....	122

6.2.6	Schlüpferfolg und Sterblichkeit in der F ₂ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol	123
6.2.7	Kreuzungsexperimente in der F ₁ -Generation des Medakas	124
6.2.8	Nachweis der Vitellogenin-mRNA-Induktion in der Leber des Medakas nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol	126
6.2.9	Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber des Medakas nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol	126
6.3	Diskussion.....	138
7.	Untersuchungen zur Wirkung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf den Medaka im Life Cycle.....	143
7.1	Einleitung	143
7.2	Wirkung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf Entwicklung, Reproduktion, Geschlechterverhältnis und Leberultrastruktur des Medakas	144
7.2.1	Schlüpferfolg und Sterblichkeit in der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA	144
7.2.2	Wachstum der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA.....	146
7.2.3	Geschlechterverhältnis der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA.....	147
7.2.4	Histologische Veränderungen in den Gonaden der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA.....	149
7.2.5	Reproduktionserfolg der F ₁ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA.....	149
7.2.6	Schlüpferfolg und Sterblichkeit in der F ₂ -Generation des Medakas nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung DHEA.....	151
7.2.7	Kreuzungsexperimente in der F ₁ -Generation des Medakas.....	151
7.2.8	Nachweis der Vitellogenin-mRNA-Induktion in der Leber männlicher Medakas nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit DHEA	152
7.2.9	Ultrastrukturelle Untersuchung der Leber des Medakas (<i>Oryzias latipes</i>) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA	154
7.3	Diskussion.....	166
8.	Abschlussdiskussion.....	167
8.1	Vergleich der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber nach Belastung mit Nonylphenol bei unterschiedlichen Fischarten.....	167
8.2	Cytopathologischen Veränderungen nach Belastung mit Östrogenen bei unterschiedlichen Fischarten.....	171
8.3	Vergleich der Ultrastruktur der Leber des Medakas (<i>Oryzias latipes</i>) nach Exposition gegenüber Nonylphenol bzw. Octylphenol.....	171
8.4	Vergleich der Veränderungen beim Medaka (<i>Oryzias latipes</i>) nach Exposition gegenüber Nonylphenol, Octylphenol, Dehydroepiandrosteron (DHEA) bzw. 17β-Estradiol im Life Cycle-Experiment.....	172
8.5	Bewertung des Gefährdungspotentials der untersuchten Substanzen	174
9.	Zusammenfassung.....	177
10.	Literatur.....	179
11.	Publikationsliste.....	197

1. Einleitung

1.1 Endokrine Disruptoren: Eine Bedrohung für Tier und Mensch?

In der heutigen hochindustrialisierten Zeit sind Menschen, Tiere und Pflanzen einer Vielzahl verschiedenartiger Chemikalien ausgesetzt. Mehr als 100.000 chemische Verbindungen sind im Europäischen Verzeichnis existierender chemischer Substanzen aufgeführt (Kommission der Europäischen Gemeinschaft 1996), und jährlich werden weltweit etwa 1000 neue Chemikalien zugelassen (Braunbeck 1995, Timbrell 1989), wobei die OECD diesen Wert inzwischen sogar auf 1500 –2000 pro Jahr schätzt (López-Barea & Pueyo 1998). Doch nicht nur die Anzahl der produzierten Substanzen steigt ständig, sondern auch ihre Produktionsmengen. Allein in der Bundesrepublik werden insgesamt etwa 30.000 unterschiedliche Chemikalien produziert, davon ungefähr 16 % in Mengen von über 10 t pro Jahr (Streit 1994, Steinhäuser 1996). Belief sich die weltweite Produktion an organischen Chemikalien 1950 noch auf 7,5 Mio. t, war sie bis 1990 bereits auf etwa 300 Mio. t pro Jahr angestiegen (Braunbeck 1995).

Während der letzten 50 Jahre verdichteten sich die Hinweise, dass einige Substanzen eine hormonähnliche Wirkung auf Organismen besitzen (Colborn & Clement 1992, Colborn et al. 1993, Sonnenschein & Soto 1998), was zu einer zunehmenden Besorgnis über die potentielle Gefährdung durch diese Substanzen führte (Arcand-Hoy & Benson 1998, Colborn 1995, Jensen et al. 1995, Nimrod & Benson 1996, Raloff 1994). Zahlreiche Reproduktions- und Entwicklungsstörungen von freilebenden Tieren konnten zwischenzeitlich auf die Wirkung sogenannter „endokriner Disruptoren“ zurückgeführt werden (Review bei Vos et al. 2000). Als endokrine Disruptoren werden exogene Substanzen bezeichnet, welche im intakten Organismus bzw. seinen Nachkommen nachteilige gesundheitliche Wirkung besitzen und sekundär Veränderungen der endokrinen Funktionen bewirken (Europäische Gemeinschaft 1997, Barollier et al. 1999). Im Gegensatz dazu werden als Xenoöstrogene Substanzen bezeichnet, welche eine östrogene Wirkung auf Organismen ausüben (Hock et al. 2000, Schwaiger & Negele 1998). Damit verursachen sie nicht nur negative Effekte auf der Ebene des Individuums, sondern auch auf Populationsebene (Hock et al. 2000, Kavlock et al. 1996).

Große Mengen dieser Substanzen erreichen über Abläufe von Kläranlagen und Industriebetrieben, welche in der Vergangenheit in England und den Vereinigten Staaten als Hauptquelle für östrogene Effekte auf Fische identifiziert wurden (Purdom et al., 1994, Folmar et al. 1996), aber auch infolge von Auswaschung über den Niederschlag die aquatischen Umwelt. Aus diesem Grund sind aquatische Organismen und Tiere, welche sich von wasserlebenden Organismen ernähren, von einer endokrinen Belastung besonders betroffen.

Negative Effekte einer endokrinen Belastung konnten bei einigen Invertebraten (z. B. Fioroni et al. 1991, Matthiessen & Gibbs 1998, Schmude et al. 1999, Zou & Fingerman 1999) sowie in allen Wirbeltierklassen nachgewiesen werden:

- Ein Rückgang der Alligatorpopulationen im Lake Apopka in Florida aufgrund von Störungen im Reproduktionssystem der männlichen Alligatoren trat nach Belastung dieses Gewässers mit endokrinen Disruptoren auf, unter denen sich Pestizide wie *o,p*-DDT, oder Diclofol befanden (Guillette et al. 1994, 1995a, 1996).

- Seevögel zeigten Beeinträchtigungen der Wildpopulationen als Folge einer endokrinen Belastung. So war an der Ostsee der Reproduktionserfolg des Seeadlers negativ mit dem Gehalt an Organochlorverbindungen in den Eiern korreliert (Helander et al. 1982, Falandysz et al. 1994). Ebenfalls durch Organochlorverbindungen hervorgerufen wurden Reproduktionsstörungen und verändertes Brutverhalten bei Möwen in Südkalifornien und an den nordamerikanischen Großen Seen (Birnbaum 1995, Fry 1995, Guillette et al. 1995b, Jones & Hayek 1995, Newbold 1995).
- Bei Weißkopfseeadlern im Gebiet der Großen Seen, aber auch bei anderen Vogelarten in Europa konnte aufgrund hoher Konzentrationen von DDE ein Rückgang des Bruterfolges beobachtet werden, nachdem die Dicke der Eischalen sich stark reduziert hatte („eggshell thinning“; Bignert et al. 1995, Koeman et al. 1972, Odsyö & Sondell 1982, Peakall et al. 1973, Ratcliffe 1967).
- Männliche Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), welche in Käfigen unterhalb von Kläranlagen im Fluss Lea gehalten wurden, zeigten einen Anstieg des Vitellogeningehalts (s. 1.5) im Plasma, welche im wesentlichen auf Alkylphenole (s.u.) zurückgeführt werden konnten (Harries et al. 1996, 1997, Purdom et al. 1994, Sumpter 1995).
- In weiteren Untersuchungen in England (Allen et al. 1999, Jobling et al. 1996, 1998, Matthiessen et al. 1998, Routledge et al. 1998, Sumpter & Jobling 1995), Schweden (Larsson et al. 1999, Förlin et al. 1999) und den Vereinigten Staaten (Folmar et al. 1996) konnte in vielen Flüssen ein Anstieg des Vitellogenin-Plasmalevels bei männlichen Fischen aufgrund der Belastung der Gewässer mit einer Vielzahl unterschiedlicher endokriner Disruptoren beobachtet werden.
- Reproduktionsstörungen sowie Veränderungen im Geschlechterverhältnis bei freilebenden Fischen konnten ebenfalls mit einer endokrinen Belastung korreliert werden (Anderson et al. 1988, Leatherland 1992, Morrison et al. 1985, Munkittrick et al. 1991, Owens 1991).
- In Flußmündungen, entlang der Küsten und in Flüssen in England traten bei Flundern (Allen et al. 1999, Matthiessen et al. 1998) und vereinzelt bei Rotaugen (Purdom et al. 1994, Jobling et al. 1998, Routledge et al. 1996) Zwittergonaden auf.

Außerdem konnten neuere Untersuchungen zeigen, dass menschliche Nahrung (Fritsche & Steinhard 1999, Holtney-Weber 2000, Könemann & Pieters 1996) und zu geringerem Teil auch das Trinkwasser (Rivera et al. 1987, Clark et al. 1992) teilweise erhebliche Konzentrationen an östrogen wirksamen Substanzen aufweist, welche in Zusammenhang mit einer verringerten Spermienzahl und -motilität bei Männern (Carlsen et al. 1995, Guzelian 1982, Sharpe & Skakkebaek 1993, Singer 1949, Toppari et al. 1996) und einem erhöhten Brustkrebsrisiko bei Frauen (Raloff 1993, Safe 1997, Wolff et al. 1993) gebracht werden. Allerdings ist der Zusammenhang zwischen xenoöstrogener Belastung und erhöhtem Brustkrebsrisiko noch umstritten (Davidson & Yager 1997, Nancy & Davidson 1998).

1.2 Substanzen mit endokriner Wirksamkeit

Obwohl bisher eine systematische Suche nach östrogen wirksamen Substanzen noch nicht stattgefunden hat, sind in der jüngeren Vergangenheit viele Umweltchemikalien mit unterschiedlichen *In vivo*- und *In vitro*-Testsystemen als Stoffe mit östrogenen Wirkung identifiziert worden (Jobling et al. 1995, Odum et al. 1997, Soto et al. 1995). Inzwischen gehen Schätzungen von etwa 70.000 Substanzen mit potentieller endokriner Wirksamkeit aus (Gillesby & Zacharewski 1998).

Endokrine Disruptoren sind natürlich vorkommende Östrogene sowie strukturverwandte Pharmaka (z. B. Ethinylestradiol), Substanzen wie Pestizide, Industriechemikalien und Schwermetalle, aber auch Phyto- bzw. Mykoöstrogene

Östrogene gehören zur Stoffklasse der Steroidverbindungen, deren gemeinsames Strukturmerkmal ein tetrazyklischer Kohlenwasserstoff darstellt (Abb. 1). Das natürliche **17 β -Estradiol** ist das weibliche Geschlechtshormon der Vertebraten (Hanson & Rafter 1983). Es wird über mehrere Zwischenstufen aus Cholesterin synthetisiert (Penzlin 1991). **Dehydroeipandrosteron** (DHEA) stellt die Zwischenstufe zwischen 17-Hydroxypregnelon und Testosteron dar. Über einen weiteren Schritt wird dann mit Hilfe der Aromatase, einer Cytochrom P450-Monooxygenase aus der Cyp1A-Familie, aus Testosteron 17 β -Estradiol gebildet. Bei Vertebraten werden die Östrogene hauptsächlich in den Ovarien produziert (Nagahama 1983), zu einem geringeren Teil jedoch auch in den Hoden und im Gehirn. Ihre Produktion wird u.a. durch neuroendokrine Hormone gesteuert, die als Gonadotropine bezeichnet werden (Kawaguchi et al. 1989, Swanson et al. 1991). **Ethinylestradiol**, das synthetische Gegenstück zu 17 β -Estradiol findet hauptsächlich in oralen Kontrazeptiva Verwendung und gilt als das potenteste Östrogen (Nimrod & Benson 1997).

Umweltöstrogene gehören einer Vielzahl von Substanzgruppen an und weisen bisweilen eine hohe Strukturheterogenität auf. Viele besitzen einen (oder mehrere) Phenolring(e), welcher analog zu einem der Ringe des Steroidgerüsts in der Lage ist, an Östrogenrezeptoren zu binden (Duax & Griffin 1985). Zu den östrogen wirksamen Substanzen gehören beispielsweise Organochlorverbindungen wie DDT und einige DDT-Isomere, HPTE (Cummings et al. 1987, Ousterhout et al. 1981), Chlordecon (Eroschenko & Palmitier 1980), Lindan (Wester 1991), Polychlorierte Biphenyle (PCBs) wie Arochlor1254 (Gellert 1978), Phthalathe (Jobling et al. 1995), aber auch die Gruppe der Alkylphenole (Soto et al. 1994).

Alkylphenole stellen die Vorstufen der Alkylphenolethoxylate und entstehen wiederum während des anaeroben Abbaus in der Kläranlage (Giger et al. 1984, Jonkers et al. 1999, Lin et al. 1999) als deren Degradationsprodukte. Alkylphenolethoxylate werden seit etwa 50 Jahren hergestellt. Die Produktionsmenge beläuft sich weltweit mittlerweile auf 500.000 t/a, bestehend aus 82 % Nonylphenol-Ethoxylaten, 15 % Octyl- sowie Dodecyl- und Dinonylphenol-Ethoxylaten (Hawlerak et al. 1999). Es handelt sich hierbei um nichtionische Tenside, welche als Detergentien, Emulgatoren und Befeuchtungszusätze in zahlreichen Anwendungen in Haushalten, Industrie und Landwirtschaft Verwendung finden (Nimrod & Benson 1996). Sie sind mit 47.000 t/a auch die am häufigsten verwendeten Waschmittelzusätze (Lind & Schade 1997). Allerdings führte das Vorhandensein einer Vielzahl an Alkylphenolethoxylaten in Waschmitteln (Marcomi et al. 1988) und ihren Abbauprodukten in den Abläufen von Kläranlagen in Deutschland und der Schweiz (Stephanou & Giger 1982, Giger et al. 1984), ihre akute Toxizität sowie ihre schlechte Abbaubarkeit in den Kläranlagen in vielen Ländern Europas dazu, dass diese Substanzen in Waschmitteln nicht mehr verwendet werden (Nair-Menon et al. 1996). Alkylphenole neigen außerdem aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften einerseits zur Adsorption an das Sediment und zur Bioakkumulation (Lewis & Lech 1996). So liegt der Biokonzentrationsfaktor für Nonylphenol bei Fischen zwischen 1,3 und 1300 (Ahel et al. 1993c, Ekelund et al. 1990). Alkylphenole sind zwar im Test 1000-100.000 fach schwächer in ihrer Östrogenwirkung als

17 β -Estradiol eingestuft worden (Sumpter 1995), jedoch sind sie in verhältnismäßig hohen Konzentrationen in der Umwelt zu finden (S. 4. Kap.).

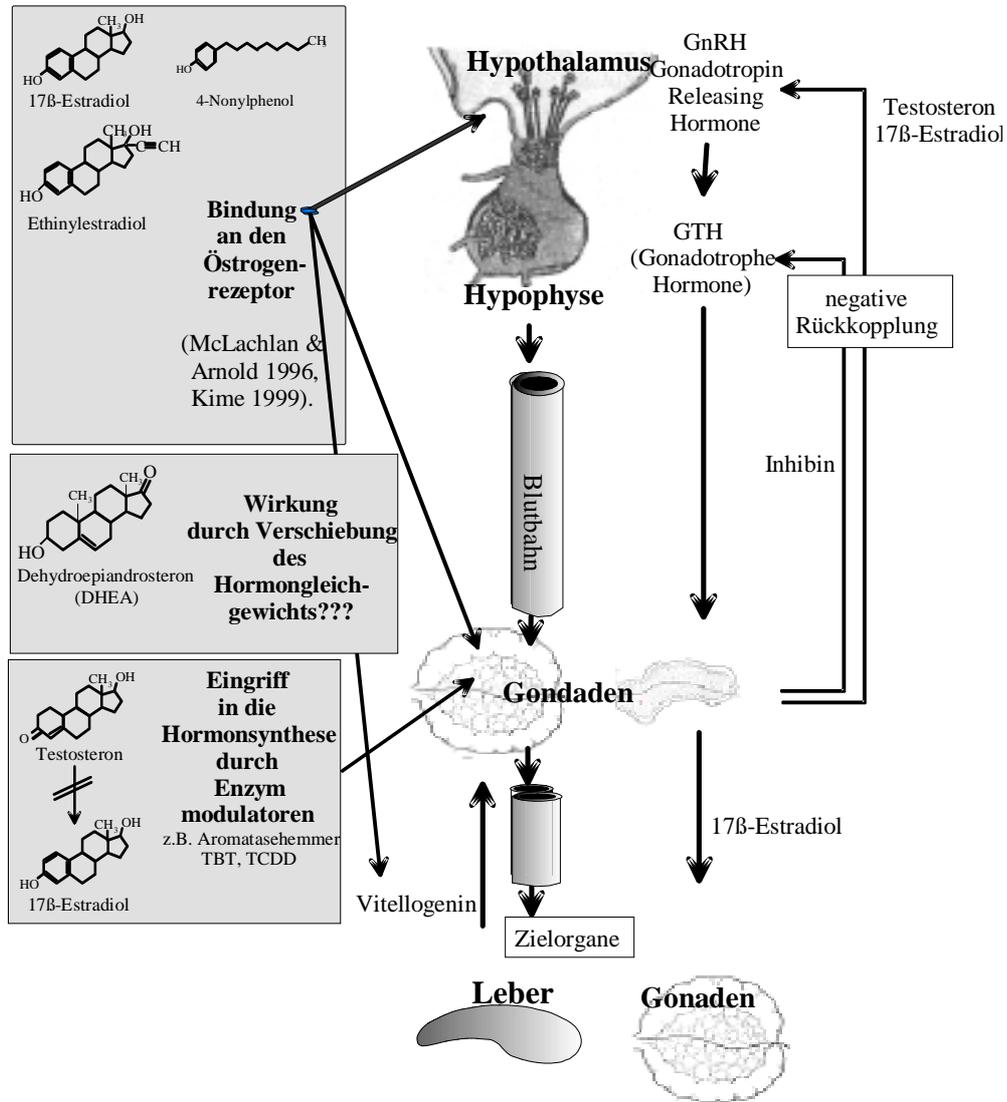


Abb. 1: Regulationskaskaden der Produktion und Wirkung von 17 β -Estradiol im Fisch und die Wirkung endokriner Disruptoren. Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) werden im Hypothalamus produziert und stimulieren die Synthese von Gonadotropinen (GTH) in der Hypophyse. Die Gonadotropine werden in die Blutbahn abgegeben und gelangen in die Gonaden, wo sie in den Ovarien in den die Oocyten umgebenden Follikelzellen die Synthese von 17 β -Estradiol und in den Leydigzellen des Hodens die Synthese von Testosteron bewirken. 17 β -Estradiol und Testosteron können je nach Konzentration fördernd oder hemmend auf Hypothalamus, Hypophyse oder Gonaden einwirken. 17 β -Estradiol wirkt außerdem als Induktor der Vitellogenese: Vitellogenin wird in der Leber synthetisiert und in den Blutkreislauf abgegeben. Anschließend wird es von den heranreifenden Oocyten im Ovar aufgenommen und zu Dotterproteinen umgebaut, von denen Lipovitellin und Phosphitin die bekanntesten sind.

1.3 Mechanismen endokriner Wirksamkeit

Das endokrine System reguliert hormonabhängige physiologische Funktionen, welche überlebensnotwendig für das Individuum und die Population sind (Hontela 1998). Natürliche Östrogene sind an Entwicklung und Funktionsregulation des weiblichen Genitaltrakts und neuroendokriner Gewebe beteiligt. Außerdem bewirken sie die Ausprägung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale (Hertz 1985, Peute et al. 1978). Die Hauptfunktion der Östrogene in Fischen ist die rezeptorvermittelte Induktion der Vitellogeninproduktion in der Leber sowie der Bildung von Zona Radiata Proteinen (Hyllner et al. 1991), die Regulation zahlreicher Stoffwechselfunktionen wie z.B. Lipid- und Protein-deposition und Ca^{2+} -Haushalt. Auf zellulärer Ebene greifen sie in die Steuerung der Zellproliferation ein. Diese Effekte werden in der Regel über die Bindung des Östrogens an Östrogenrezeptoren (ER) vermittelt. Bisher konnten zwei unterschiedliche Subtypen (α und β) identifiziert werden. Der Östrogenrezeptor α ist in den klassischen Zielorganen der Östrogenwirkung, also in Leber und Gonade zu finden. Der Östrogenrezeptor β ist außerdem u. a. in einigen Bereichen des Gehirns anzutreffen (Kuiper et al. 1996, 1997). Die Regulation der 17β -Estradiol-Synthese und die Interaktion von 17β -Estradiol mit der Vitellogenese in der Leber sind in Abb. 1 dargestellt.

Endokrin wirksame Substanzen können je nach Struktur ihre Wirkung auf unterschiedliche Art entfalten:

1. Die direkte Bindung an den (östrogenen oder androgenen) Hormonrezeptor (McLachlan & Arnold 1996, Kime 1999). Diese Xenoöstrogene imitieren in der Regel die Wirkung der natürlichen Hormone (Alkylphenole: Mueller & Kim 1987, Shelby et al. 1996, Tabira et al. 1999, White et al. 1994; DDT-Isomere: Garland et al. 1987, einige PCB's: Bitman & Cecil 1970, Safe 1995).
2. Wirkung als Rezeptorantagonist, was zur Blockierung der normalen Hormonbindung und -Funktion führt (*p,p'*-DDE: Kelce et al. 1995).
3. Bindung an Plasmaproteine und damit kompetitive Hemmung der Bindung natürlicher Östrogene
4. Direkter Eingriff in den Hormonstoffwechsel beispielsweise über eine Hemmung der Aromataseaktivität (TCDD: Safe et al. 1991).

Je nach Wirkungsart und -ort können endokrine Disruptoren entweder östrogene, antiöstrogene, androgene oder antiandrogene Effekte verursachen (Sumpter 1995).

1.4 Organisationsebenen

Da die Anpassung an die Umwelt ein hierarchischer Prozess ist und auf unterschiedlichen Ebenen biologischer Organisation stattfindet (Braunbeck 1994, Lloyd 1992, Stebbing 1985, Vogt 1987), findet jede Organisationsstufe ihre mechanistische Erklärung auf der nächst niederen Organisationsebene (Batholomew 1964). Demzufolge werden makroskopisch sichtbare Veränderungen immer von Veränderungen auf molekularer, zellulärer oder Organebene begleitet (Segner & Braunbeck 1990). Andererseits müssen jedoch auf jeder Ebene der biologischen Organisation zahlreiche Kompensations- und Reparaturmechanismen überwunden werden, bevor ein Effekt auf der nächst höheren Organisationsebene zu beobachten ist (Gillesby & Zacharewski 1998, Zacharewski 1998). Aus diesem Grund ist,

obwohl in vielen Fällen negative Auswirkungen einer östrogenen Belastung auf das Individuum nachgewiesen werden konnten, die Bedeutung dieser Beobachtungen auf Populations- und Ökosystemebene noch weitgehend unklar (Harries et al. 1998, Kramer et al. 1998).

Tab. 1: Organisationsstufen biologischer Systeme und Methodik zu deren Messung

Organisationsstufe	Meßendpunkte	Untersuchungsmethodik
Ökosystem/ Gemeinschaft	Artenzusammensetzung	Kartierungen und mathematische Modelle
	Artendiversität	
	Funktionale Indizes (z.B. Produktivität, Energiefluß)	Struktur und Funktion
Population	Altersstruktur	Zählungen
	Größen-Alters-Beziehung	Life Cycle -Experimente
	Geschlechterverhältniss	Multigenerationsexperimente
	Abundanz	
	Diversität Zuwachs	Zählungen
Individuum	Fitness, Verhalten	
	Größe/Entwicklung	
	Überleben	
	Vgl. phänotypisches und genetisches Geschlecht	Kurzzeitexpositionen, Life Cycle -Experimente
	Fruchtbarkeit	
	Reproduktionserfolg	
Hormonstatus, Konzentrationen von Hormonen Biomarker	Messung z.B. der Vitellogenin-Induktion	
Organ	Histologische Veränderungen von Zielorganen (z.B. Gonaden)	Lichtmikroskopie
Zelle	Ultrastrukturelle Veränderungen in Zielorganen östrogenen Wirkung (z.B. Leber)	Elektronenmikroskopie, Immunocytologie
Molekulare Ebene	Aktivierung von Enzymsystemen	z. B.: Rezeptor-Protein-Bindungs Assays

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Testsysteme auf unterschiedlichen Organisationsstufen entwickelt, um die Auswirkungen einer Exposition gegenüber Umweltschadstoffen zu untersuchen.

1.5 Testsysteme

Die Bewertung einer Substanz kann anhand ihres östrogenen Potentials in einer Vielzahl von Testverfahren erfolgen. Dabei sind grundsätzlich *In vivo*- und *In vitro*-Tests zu unterscheiden. Der Vorteil der *In vitro*-Tests liegt einerseits in ihrer schnellen Durchführbarkeit und darin, dass auf Tierversuche verzichtet werden kann. Andererseits kann man *in vitro* das System in vielen Fällen soweit modifizieren, dass es nur noch einen einzigen Effekt als Reaktion auf Belastung zeigt (Bsp. Rezeptor-

Bindungstests; Danzo 1997, Nimrod & Benson 1997). Gegenwärtig existieren eine ganze Reihe *In vitro*-Testverfahren zur Ermittlung einer endokrinen Wirksamkeit: verschiedene Tests zur kompetitiven Ligandenbindung (Ruth et al. 1942, Gorski & Raker 1974), Zellproliferation (MCF-7-Assay; Soto & Sonnenschein 1985), endogene Proteinexpression oder Enzymaktivität (Heppell et al. 1995), rekombinante Rezeptor/Reporter Assays (Balaguer et al. 1996, Gillesby et al. 1997, Zacharewski et al. 1995, Zacharewski et al. 1994), sowie auf rekombinanten Hefezellen und Zelllinien basierende Assays (E-Screen: Arnold et al. 1996).

Allerdings besitzen *In vitro*-Testverfahren in der Regel nicht die Kompensations- und Regulationsmöglichkeiten eines vollständigen Organismus (Beresford et al. 2000). Aus diesem Grund beschränkt sich die Aussagekraft eines *In vitro*-Testverfahrens oft nur auf das östrogene Potential einer Substanz. Im Gegensatz dazu kann mit Hilfe von *In vivo*-Expositionen die Reaktion des intakten Organismus auf Belastung getestet werden. Die am häufigsten verwendeten *In vivo*-Assays zur Überprüfung einer endokrinen Potenz ist die Induktion des Uteruswachstums (Dorfman & Dorfman 1954, Hisaw 1959, Rubin et al. 1951) und der Vaginaepithelverhornung (Jones & Edgren 1973, Martin & Claringbold 1960) bei Ratten. Der folgende Abschnitt soll eine kurze Übersicht über weitere Testverfahren mit einem besonderen Schwerpunkt auf die in dieser Untersuchung verwendeten Tests geben.

Rezeptor-Bindungs-Assays

Ziel dieser Assays ist wie auch bei den *In vitro*-Assays die Bindung an den Östrogenrezeptor (Petit et al. 1999, Tremblay et al. 1995), jedoch existieren auch Assays für die Bindung an den Androgenrezeptor (El-Alfi et al. 1998).

Messung des Plasma-Vitellogeningehalts mit Hilfe von ELISA bzw. RIA

Vitellogenin ist ein in der Leber von weiblichen oviparen Vertebraten produziertes Lipoglykophosphoprotein, welches die Vorstufe von Dotterproteinen darstellt. Es handelt sich um ein Molekül mit einem Gewicht, das je nach Art zwischen 250.000 - 600.000 Da variiert (Norberg & Haux 1985).

Männliche Fische produzieren unter normalen Umständen kein Vitellogenin (Mommsen & Walsh 1988, Sumpter 1995), reagieren jedoch auf die Exposition gegenüber östrogen wirksamen Substanzen mit einem Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts (Copeland et al. 1986, Ilder & Campbell 1980). Da die Vitellogeninproduktion sehr schnell nach der Belastung mit Hilfe von ELISA oder RIA nachgewiesen werden kann, ist der Vitellogeningehalt in männlichen Fischen in den vergangenen Jahren zu einem der wichtigsten Biomarker einer östrogenen Belastung bei vielen unterschiedlichen Fischarten geworden (Regenbogenforelle: Bon et al. 1997, Jobling et al. 1998, Bachforelle: Sherry et al. 1999, Dickkopfelritze: Parks et al. 1999, *Ictalurus punctatus*: Monteverdi & Di Gulio 1999) Vorteile der Messung des Vitellogeningehalts mit Hilfe des ELISAs liegen in der hohen Verlässlichkeit und Sensitivität, Schnelligkeit und dem Fehlen von radioaktiven Substanzen (Bon et al. 1997).

mRNA-Messungen der Genexpression von Vitellogenin auf transkriptioneller Ebene

Die Messung des Vitellogenin-mRNA-Gehalts mit Hilfe einer RT-PCR oder einem Dot Blot-Verfahren stellt eine weitere sensitive Möglichkeit dar, eine endokrine Belastung bei Fischen abzuschätzen (Islinger et al. 1999). Vaillant et al. (1988) zeigten, dass die Messung der Vitellogenin-

mRNA in Primärzellkulturen um den Faktor 10 sensitiver war als die Vitellogeninmessung mit dem ELISA.

Ultrastrukturelle vergleichende Untersuchung der Leber

Die Leber ist bei Vertebraten als das zentrale Organ für zahlreiche Stoffwechselfunktionen der Hauptort der Bioakkumulation, Biotransformation und Exkretion von Umweltschadstoffen (Braunbeck 1994, Braunbeck 1992, Braunbeck & Völkl 1993, Arias et al. 1988, Gingerich 1982, Meyers & Hendricks 1985). Gerade lipophile endokrin wirksame Substanzen wie Alkylphenole werden in der Leber glucuroniert und über die Galle ausgeschieden (Arukwe et al. 2000, Coldham et al. 1998, Lewis & Lech 1996, Mehldahl et al. 1996, Thibaut et al. 1998). Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass Hepatocyten den primären Wirkungsort einer Intoxikation darstellen. Die Ultrastruktur der Leber von Vertebraten hat sich in zahlreichen *In vivo*- und *In vitro*-Experimenten als geeignetes und sensibles Instrument zum Biomonitoring von Schadstoffen und Schadstoffgemischen erwiesen (Arnold & Braunbeck 1994, Baski & Frazier 1990, Braunbeck 1994, Braunbeck et al. 1990a, b, Braunbeck et al. 1992a, Gagné & Blaise 1995, Oulmi et al. 1995, Oulmi et al. 1996, Peute et al. 1985, Schnurstein et al. 1998, Strmac & Braunbeck 1999, Strmac & Braunbeck 2000, Zahn et al. 1995).

Besondere Bedeutung gewinnt die ultrastrukturelle Untersuchung der Leber als Biomarker einer endokrinen Belastung auch dadurch, dass sie der Ort der Vitellogenese ist (Chen et al. 1986) und eine Induktion der Vitellogenese sich auch in der Ultrastruktur der Hepatocyten widerspiegelt (Peute et al. 1978, 1985). Während der Translation der Vitellogenin-mRNA wird die wachsende Peptidkette in das rauhe endoplasmatische Reticulum (rER) aufgenommen und teilweise phosphoryliert. Zu einer weiteren Phosphorylierung kommt es im COOH-terminalen Bereich der Peptidkette in den Transportvesikeln zum Golgi-Apparat, wo auch die Glykosylierung beginnt, die im Golgi-Apparat dann abgeschlossen wird. Das Vitellogenin wird in sekretorische Vesikel verpackt und in den Blutkreislauf abgegeben (Zusammenfassung bei Wallace 1985). Das Vitellogenin wird vom Ovar aufgenommen und zu Dotterproteinen umgebaut, von denen die Lipovitelline und Phosphitine die bekanntesten sind (Sire et al. 1994). Die Vitellogenese bewirkt bei laichreifen Fischen einen ausgeprägten Sexualdimorphismus der Hepatocyten. Aufgrund der Tatsache, dass bei weiblichen Fischen in den Hepatocyten wichtige Schritte zur Synthese von Dottermaterial für die Eier ablaufen, ist der Proteinsyntheseapparat, also rER (Synthese) und Golgi-Apparat (Modifikation und Export) in der Leber geschlechtsreifer Weibchen sehr viel stärker ausgeprägt als bei den Männchen, bei denen die Speicherung von Reservestoffen wie Lipid und Glykogen in den Leberzellen im Vordergrund steht (Braunbeck et al. 1989, 1993).

Messung der Plasma-Steroidkonzentrationen mit Hilfe von ELISA oder RIA

Wie die Plasma-Vitellogeninlevels reagieren auch die Steroidkonzentrationen im Plasma auf eine endokrine Belastung (McMaster et al. 1991, 1995, Munkittrick et al. 1991). So konnte gezeigt werden, dass bei einigen Fischarten die Androgenwerte im Blutplasma nach Gabe von 17β -Estradiol erniedrigt waren (Jobling et al. 1996, Trudeau et al. 1993).

Geschlechtsdifferenzierung und sekundäre Geschlechtsmerkmale

Die Geschlechtsdifferenzierung stellt einen wichtigen Angriffspunkt endokriner Disruptoren dar. In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es unter Exposition gegenüber Substanzen mit endokriner Wirkung bei Fischen zur Ausbildung von Zwittergonaden (Engami 1955, Gray & Metcalfe 1997, Gray et al. 1999a) oder zur Verschiebung des Geschlechterverhältnisses (Scholz & Gutzeit 2000) bis hin zur völligen Geschlechtsumkehr kommen kann (Iwamatsu 1999, Krisfalushi & Cloud 1999, Yamamoto 1953, 1965).

Gonadosomatischer Index

Veränderungen im Gonadosomatischen Index (GSI) stellen einen weiteren wichtigen Endpunkt einer endokrinen Belastung dar. Eine Reihe von Untersuchungen konnte einen Zusammenhang zwischen einer endokrinen Belastung und dem Rückgang des GSI bzw. dem Rückgang des testikulären Wachstums feststellen (Christiansen et al. 1998, Condeça & Canario 1999, Jobling et al. 1996).

Reproduktionserfolg

Der Reproduktionserfolg ist wohl der wichtigste Endpunkt einer endokrinen Belastung auf der Ebene der Population. Er findet seinen Ausdruck in Parametern wie Befruchtungsrate, Sexualverhalten, Schlüpftrate oder Gelegegröße und Überleben der Nachkommen (Arcand-Hoy & Benson 1998).

Life Cycle-Tests als Beispiel einer chronischen Belastung über mehrere Generationen

Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von *In vivo*-Testparametern und -methoden in Frage kommen, um eine endokrine Belastung zu untersuchen. Darüber hinaus wird jedoch auch deutlich, dass die Aussagekraft der einzelnen Parameter sehr von der Art der Exposition abhängig ist. Aufgrund der möglichen Gefahren für Mensch und Umwelt stehen jene Endpunkte im Vordergrund des Interesses, welche auf Populationsebene angesiedelt sind. Deswegen legte beispielsweise die Amerikanische Umweltbehörde (EPA) Life Cycle-Tests sowie Early Life-stage-Tests zur Abschätzung einer toxischen Wirkung von Umweltchemikalien in ihren Richtlinien fest (U. S. Environmental Protection Agency 1996a, b). Life Cycle-Tests bieten die Möglichkeit, die Auswirkung einer chronischen Exposition gegenüber einer Substanz auf das Einzelindividuum und die Population über eine oder mehrere Generationen anhand einer Vielzahl von Parametern zu untersuchen. Der klassische Life Cycle-Test beinhaltet eine Exposition ab der Befruchtung bis zur Geschlechtsreife, gefolgt von einem Early Life-stage-Experiment der 2. Generation unter Belastung. Die geforderten Endpunkte beinhalten Reproduktionsfaktoren wie Wachstum, Schlüpfertag, Überleben, Befruchtungserfolg, Gelegegröße sowie histologische Endpunkte. Aufgrund der Vielfalt der möglichen Parameter kann ein recht genaues Bild der Wirkung des verwendeten Schadstoff gezeichnet werden. Die Nachteile des Life Cycle-Experiments liegen vor allem in der Dauer und den dadurch verursachten Kosten. Dennoch bietet der Life Cycle die Möglichkeit, bei Wahl geeigneter Versuchsfische wie z. B. dem Medaka (*Oryzias latipes*) oder dem Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) innerhalb eines Jahres auch Multigenerations-Untersuchungen durchzuführen, wie sie von einigen Autoren gefordert werden (Arcand-Hoy & Ben-

son 1998, Gillesby & Zacharewski 1998, Patyna et al. 1999), da bisher Daten zur chronische Exposition gegenüber endokrin wirksamen Substanzen über mehrere Generationen noch völlig fehlen.

1.6 Ziele der Arbeit

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der durch endokrin wirksamen Substanzen verursachten endokrinen Effekte auf verschiedene Fischarten in unterschiedlichen Expositionsszenarien. Bei den verwendeten Testsubstanzen handelte es sich um die Alkylphenole Nonylphenol und Octylphenol und um die Steroide Dehydroepiandrosteron, 17 β -Estradiol und 17 α -Ethinylestradiol.

In der vorliegenden Untersuchung sollten im einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

- Korrelieren die Biomarker Vitellogeninsynthese und Cytopathologie der Leber als Syntheseort des Vitellogenins in ihrer Antwort auf eine östrogene Belastung?
- Gibt es Unterschiede in der Sensitivität der Biomarker Vitellogenininduktion und Leberultrastruktur?
- Wie reagieren männliche und weibliche Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in unterschiedlichen Lebensstadien auf eine Belastung mit Nonylphenol?
- Kann die Reaktion auf nonylphenolhaltige Kläranlagenabläufe in Bezug auf Induktion der Vitellogeninsynthese und cytopathologische Veränderungen in der Leber juveniler Karpfen (*Cyprinus carpio*) in Einklang gebracht werden mit der Belastung durch die Monosubstanz Nonylphenol?
- Wie reagieren männliche Regenbogenforellen individuell auf eine Belastung mit Ethinylestradiol bzw. ethinylestradiolhaltigen Kläranlagenabläufen?
- Welche reproduktions- und populationsrelevanten Veränderungen zeigen Medakas (*Oryzias latipes*) nach einer zwei Generationen umfassenden Exposition gegenüber Nonylphenol?
- Welche Auswirkungen hat eine Exposition gegenüber Octylphenol im Life Cycle-Experiment auf den Medaka?
- Welche Auswirkungen hat eine Exposition gegenüber Dehydroepiandrosteron (DHEA) im Life Cycle-Experiment auf den Medaka (*Oryzias latipes*)?
- Inwieweit ist eine Exposition gegenüber Nonylphenol bzw. Octylphenol in ihren Effekten auf den Medaka (*Oryzias latipes*) vergleichbar?
- Wie reagieren unterschiedliche Fischarten cytopathologisch auf eine Belastung mit Nonylphenol?
- Welche cytopathologischen Veränderungen ruft eine Belastung mit Xenooestrogenen bei unterschiedlichen Fischarten hervor?
- Kann anhand der durchgeführten Experimente eine Aussage über eine populationsrelevante Gefährdung durch Nonylphenol, Octylphenol, 17 α -Ethinylestradiol, 17 β -Estradiol und DHEA abgeleitet werden?

2. Material und Methoden

Die untersuchten Endpunkte der einzelnen Experimente sind in Tab. 2 zusammengefasst. Die praktische Durchführung der unter 2.1.-2.4 beschriebenen Expositions-Versuche erfolgte durch das Bayerische Landesamt für Wasserforschung in der Versuchsanlage Wielenbach unter der Leitung von Herrn Dr. R. D. Negele.

Tab. 2: Untersuchte Endpunkte der einzelnen Experimente

Parameter	Karpfen Großblappen	Karpfen Nonylphenol	Adulte Forellen Nonylphenol	Juvenile Forellen Nonylphenol	Forellen Starnberger See	Life Cycle Medaka Nonylphenol	Life Cycle Medaka Octylphenol	Life Cycle Medaka DHEA
Vg-mRNA						3 ♂	4 ♂	5-8 ♂
Messung des Plasma Vg-Gehalts	WB	WB	ELISA	ELISA	ELISA	-	-	-
Ultrastrukturelle Veränderungen								
Leber	4	6	2♂/2♀	2♂/2♀	-	4♂/4♀	4♂/4♀	4♂/4♀
Histologische Untersuchung								
Gonaden	-	-	-	-	-	F ₁ , F ₂	F ₁	F ₁
Leber	4	6	2♂/2♀	2♂/2♀	-	4♂/4♀	4♂/4♀	4♂/4♀
Entwicklungsparameter								
Befruchtungsrate	-	-	-	-	-	F ₁ -F ₃ ,	F ₁ , F ₂	F ₁ , F ₂
Early Life Stage-Test	-	-	-	-	-	F ₁ -F ₃	F ₁ , F ₂	F ₁ , F ₂
Mortalität, Schlüpfertfolg	-	-	-	-	-	F ₁ -F ₃	F ₁ , F ₂	F ₁ , F ₂
Wachstumsparameter	-	-	-	-	-	F ₁ , F ₂	F ₁	F ₁
Geschlechterverhältnis	-	-	-	-	-	F ₁ , F ₂	F ₁	F ₁
Reproduktionsversuche	-	-	-	-	-	-	F ₂	F ₂

Vg = Vitellogenin, WB = Vitellogeninmessung mit Western Blot; F₁: erste Generation unter Belastung, F₂: zweite Generation unter Belastung, F₃: dritte Generation unter Belastung. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Anzahl der in den einzelnen Versuchsteilen pro Versuchsgruppe untersuchten Fische.

2.1 Testorganismen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion auf endokrine Belastung auf Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), Karpfen (*Cyprinus carpio*) und Medaka (*Oryzias latipes*) untersucht. Diese 3 Fischarten sollen in diesem Abschnitt kurz vorgestellt werden.

2.1.1 Die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)



Abb. 2: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Die ursprünglich in Nordamerika beheimatete Regenbogenforelle (Abb. 2) wird häufig für Laboruntersuchungen herangezogen. Sie erreicht mit 2-3 Jahren die Geschlechtsreife und ihre Laichzeit dauert etwa von Dezember bis Mai (Ladiges & Vogt 1979). Die Ultrastruktur der Leber der Regenbogenforelle ist die bisher am besten untersuchte (Braunbeck 1998), was sie für vergleichende cytopathologische Forschung sehr geeignet macht.

2.1.2 Der Karpfen (*Cyprinus carpio*)



Abb. 3: Karpfen (*Cyprinus carpio*)

Der Karpfen (Abb. 3), ursprünglich als Speisefisch in der Teichwirtschaft eingeführt, ist in den heimischen Flüssen und Seen in Grundnähe weit verbreitet und daher ein geeigneter Fisch für die Untersuchung umweltrelevanter Belastung. Darüber hinaus ist seine Empfindlichkeit gegenüber niedrigem Sauerstoffniveau und Schadstoffbelastung geringer als bei der Regenbogenforelle. Seine Laichzeit ist von Mai bis Juli.

2.1.3 Der Medaka (*Oryzias latipes*)



Abb. 4: Männlicher und weiblicher Medaka (*Oryzias latipes*)

Der Medaka (*Oryzias latipes*) (Abb. 4) ist neben dem Zebraquarienfisch einer der am häufigsten verwendeten Fische für Laboruntersuchungen. Er wird als zur Familie der Ardanichthyidae gehörend der Unterordnung der Beloiformes zugeordnet. Die geringe Generationsdauer von 8-13 Wochen (Arcand-Hoy & Benson 1998), seine geringe Größe und seine Anspruchslosigkeit machen ihn besonders geeignet für Langzeituntersuchungen. Darüber hinaus ist die Geschlechtsdifferenzierung des Medakas verhältnismäßig gut untersucht (Yamamoto 1959, 1965, 1953).

Ursprünglich in Südostasien und Japan verbreitet, ist die natürliche Brutzeit des Medakas von April – September, er kann jedoch unter gleichmäßigen Laborbedingungen (26 °C, Licht:Dunkel-Periode 12:12 Stunden) das ganze Jahr über nahezu täglich zum Abläichen gebracht werden (Kirchen & West 1976). Die Weibchen besitzen neben einer auffälligen Urogenitalpapille deutlich ausgebildete After- und Rückenflossen, welche bei der in der vorliegenden Studie verwendeten Goldvariation des Wildtyps auffallend orange gefärbt ist. After- und Rückenflosse der Männchen sind vergrößert und ungefärbt. Außerdem weist die Rückenflossen eine deutliche Einkerbung zwischen dem vorletzten und letzten Flossenstrahl auf (Yamamoto 1975). Die Eientwicklung dauert etwa 15 Tage.

2.2 Exposition juveniler Karpfen (*Cyprinus carpio*) gegenüber Nonylphenol- und Abwasser der Kläranlage München Nord (Großlappen)

Als Versuchstiere wurden 4 Monate alte Karpfen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von $15,2 \pm 3,8$ g verwendet. Die Tiere wurden kontinuierlich über einen Zeitraum von 70 Tagen Konzentrationen von 1, 5, 10 und 15 µg/L Nonylphenol exponiert. Die Exposition erfolgte in 100 L-Aquarien im Durchfluss, wobei pro Konzentration je 22 Individuen im Doppelansatz belastet wurden. Außerdem wurde eine Versuchsgruppe mit 0,02 ‰ Ethanol als Lösungsmittelkontrolle belastet. Parallel dazu wurden unbehandelte Fische unter ansonsten identischen Bedingungen als Wasserkontrolle gehalten. Einer Positivkontrolle wurde über den gesamten Versuchszeitraum insgesamt dreimal 17α-Ethinylestradiol (500 µg/kg Körpergewicht) intramuskulär (i. m.) injiziert. 17α-Ethinylestradiol (EE2) wurde in Ethanol vorgelöst und in 0,85 ‰iger physiologischer NaCl-Lösung verabreicht.

Die Fütterung erfolgte einmal pro Tag mit einem Forellenbrutfutter (BioMar A/S, Brande, Dänemark). Die verabreichte Futtermenge entsprach ca. 1 % des Körpergewichts. Die Haltung erfolgte mit einer 15 Stunden-Lichtperiode und einer Dämmerungsphase von je 30 min morgens und abends. Zwei weitere Versuchsgruppen (je 22 juvenile Karpfen mit einem Körpergewicht von $14,87 \pm 3,98$ g) wurden für 35 Tage kommunalem Abwasser ausgesetzt. Die Tiere wurden im Versuchsfeld Großlappen im Anschluss an zwei halbtechnische Versuchskläranlagen (Schade et al. 1997) in 90 L-Testaquarien unter Tageslichtbedingungen gehalten. Die Aquarien wurden mit bereits mechanisch und biologisch geklärtem Münchner Abwasser gespeist (Durchfluss: 6 m³/Tag, reale Nonylphenol-Belastung: 1 µg/L). Die Wassertemperatur lag bei durchschnittlich $15 \pm 1,5$ °C, der Sauerstoffgehalt des Wassers bei 5 mg/L. Während eine Gruppe ausschließlich dem nachgeklärten Abwasser exponiert war, wurde in der 2. Gruppe dem Abwasser die nonylphenolhaltige Industriechemikalie Arkopal N-150[®] (Hoechst AG; reale Nonylphenolbelastung: 10 µg/L) beigemischt.

2.3 Exposition adulter Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) gegenüber Nonylphenol

Vierjährige Regenbogenforellen (24 Fische pro Gruppe) mit einem Körpergewicht von $1667 \pm 201,6$ g wurden während der Gonadenreife (Juli – November) 1-4 x über einen Zeitraum von jeweils 10 Tagen pro Monat mit 4-Nonylphenol in Konzentrationen von 1 und 10 µg/L (Realkonzentrationen) belastet. Als Positivkontrollen dienten Regenbogenforellen, denen über den gleichen Zeitraum 1-4 x pro Monat 500 µg/kg Körpergewicht 17α-Ethinylestradiol (i. m.) gespritzt wurde. In reinem Quellwasser gehalten.

tene Regenbogenforellen dienten als Negativkontrolle. Da die Expositionen gegenüber Nonylphenol und 17 α -Ethinylestradiol zeitlich um 1 Jahr (1 Laichzyklus) versetzt waren, wurde für die EE2-Exposition eine gesonderte Kontrolle (Ethinylestradiolkontrolle) mitgeführt. Für die Messung des Vitellogeningehalts im Plasma wurden aus jeder Gruppe je 16 männliche und 8 weibliche Tiere untersucht. Zur cytopathologischen Untersuchung wurden die Lebern von je 2 Männchen und 2 Weibchen verwendet.

Die Tiere aller Versuchsgruppen wurden bis zum Expositionszeitraum und in den Intervallen zwischen den Expositionen in 30 m³ großen Betonteichen gehalten. Bis zum Versuchsbeginn und in der expositionsfreien Zeit erfolgte die Fütterung der Tiere einmal täglich mit handelsüblichen pelletiertem Laichfischfutter (Kronen-Fisch Laich 500 E, 8 mm; Kottmann GmbH, Wesel). Die Futtermenge betrug 1,5 % des Körpergewichts.

2.4 Exposition juveniler Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) gegenüber Nonylphenol

In einem Langzeitversuch wurden juvenile Regenbogenforellen ab dem befruchteten Ei über einen Zeitraum von 12 Monaten kontinuierlich mit 1 und 10 μ g/L Nonylphenol (Realkonzentration) belastet. Als Positivkontrolle dienten Regenbogenforellen, welchen über den Versuchszeitraum insgesamt 6 x 500 μ g/kg Körpergewicht 17 α -Ethinylestradiol gespritzt wurde. Als Kontrollen wurde neben einer Wasserkontrolle auch eine Lösungsmittelkontrolle mit 0,002 % Dimethylsulfoxid (DMSO) mitgeführt. Für die Messung des Vitellogeningehalts wurde das Plasma von jeweils 13-16 männlichen und 14-24 weiblichen Regenbogenforellen untersucht. Zur cytopathologischen Untersuchung wurden die Lebern von je 2 Männchen und 2 Weibchen verwendet.

2.5 Exposition adulter Forellen (*Oncorhynchus mykiss*) gegenüber der Ringkanalisation Starnberger See

Die Belastung mit Kläranlagenabwasser der Ringkanalisation „Starnberger See“ erfolgte im Bypass. Das Abwasser 1:12 wurde mit Würmwasser verdünnt. Würmwasser wurde deshalb gewählt, weil die Würm den Ablauf des Starnberger Sees darstellt. Die Experimente wurden mit je 10 dreijährigen männlichen Forellen pro Ansatz durchgeführt. Die Expositionszeit betrug 4 Wochen. Die Forellen wurden mit einem Transponderchip (i. m.) markiert, wodurch sie mit Hilfe eines Lesegerätes individuell identifiziert werden konnten. Den Forellen wurde jeweils vor und nach der Exposition 1 ml Blut abgenommen. Als Positivkontrolle dienten Forellen, denen 2 x 1 mg/kg Körpergewicht 17 α -Ethinylestradiol (erstmalig zu Beginn der Exposition und nach 14 Tagen) injiziert wurde.

2.6 Life Cycle-Experimente mit dem Medaka (*Oryzias latipes*)

Der verwendete Zuchtstamm (Wildtyp) wurde uns freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. J. Wittbrodt, Max Planck Institut für Biophysik, Göttingen, zur Verfügung gestellt.

2.6.1 Verwendete Testsubstanzen in den Life Cycle-Experimenten

Insgesamt wurden 3 Life Cycle Experimente durchgeführt. Die getesteten Substanzen sind Tab. 4, die untersuchten Endpunkte der verschiedenen Generationen sind Tab. 2 zu entnehmen.

Nonylphenol, Octylphenol und Dehydroepiandrosteron (DHEA)

Nonylphenol, Octylphenol und DHEA wurden in einer ersten Stammlösung in DMSO (Baker, Deventer) gelöst (1 mg/ml DMSO). In den Vorratsflaschen erfolgte die Verdünnung mit Wasser, so daß eine Mischung von 2 L/h Aquarienwasser aus dem Zulauf mit 50 ml/h Schadstoff die entsprechende Endkonzentration ergab (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht über die in den Life Cycle Experimenten verwendeten Substanzen und Konzentrationen

Substanz	Negativkontrolle	Schadstoffkonzentration	Positivkontrolle
Nonylphenol	Wasser, 0,02 % DMSO	2, 20, 50 µg/L	100 ng/L 17β-Estradiol
Octylphenol	Wasser, 0,01 ‰ DMSO	2, 20, 50 µg/L	100 ng/L 17β-Estradiol
DHEA	Wasser, 0,01 ‰ DMSO	100 ng/L, 2, 20, 100 µg/L	-

Die Nonylphenolkonzentration in den Aquarien wurde über den Versuchszeitraum (9 Monate) insgesamt dreimal durch eine Analyse der Firma Mayer Umweltanalytik GmbH aus Fürstfeldbruck überprüft.

17β-Estradiol

Verwendet wurde wasserlösliches 17β-Estradiol (Sigma, Deisenhofen) in einer Stammlösung von 200 mg/L (\pm 10 mg/L reinem 17β-Estradiol).

2.6.2 Versuchsaufbau und Tierhaltung bei Belastung mit Nonylphenol

Die unbelasteten Elterntiere (im Folgenden als F₀-Generation bezeichnet) wurden für etwa 14 Tage in Gruppen von je 2 Weibchen und einem Männchen in Becken mit einem Volumen von 9 L gehalten. Zur Stimulation des Laich- und Balzverhaltens wurde in jedes Abblanchbecken ein Trieb Hornkraut (*Ceratophyllum demersum*) gelegt.

Die Haltung aller Tiere erfolgte bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h. Die Wassertemperatur betrug 25 °C \pm 0,5 °C. Weitere Wasserparameter, welche regelmäßig kontrolliert wurden, sind Tab. 4 zu entnehmen.

Das verwendete, aufbereitete Aquarienwasser stammte aus einer automatischen Mischeinrichtung, die nach Messung der Leitfähigkeit das Verhältnis von Leitungswasser und vollentsalztem Wasser über Zulaufventile regelte. Zusätzlich wurde das Wasser im Vorratstank geheizt (25 °C) und belüftet.

Medakaweibchen laichen in der Regel 1-4 Stunden nach Einsetzen der Beleuchtung. Die eiertragenden Weibchen wurden gefangen und die Eier vorsichtig mit Hilfe eines Spatels vom Hinterleib abgestreift. Nachdem die Eier, die normalerweise in Klumpen zusammenhängen, mit Hilfe von Spatel und Impföse vorsichtig vereinzelt wurden, wurden sie in Petrischalen (Ø 18 cm) mit 200 ml steriler Ringerlösung (10 % NaCl, 0,3 % KCl, 0,4 % CaCl₂*2H₂O, 1,63 % MgSO₄*7H₂O in Aqua bidest) plus der entsprechenden Menge Schadstoff überführt. In den Petrischalen wurde die Schadstofflösung täglich gewechselt. Die Inkubation der Eier bis zum Schlüpfen erfolgte in einem Brutschrank bei 25 ± 0,5 °C (Tag-Nacht-Rhythmus: 12 Stunden).

Tab. 4: Wasserparameter von Aquarien und Vorratsbehälter

Wasserparameter	Aquarien	Vorratsbehälter
Temperatur	25 °C	25 °C
Sauerstoffgehalt	7,5 mg/L	8,0 mg/L
Gesamthärte	20° dH	20° dH
Carbonathärte	12° dH	12° dH
Ammonium	n.n	n.n.
Nitrit	0,01 mg/L	n.n.
Nitrat	48 mg/L	20 mg/L
pH-Wert	7,6	7,8

Gesamt- und Carbonathärte, Ammonium-, Nitrit- und Nitratgehalt wurden mit Schnelltests der Firma Merck (Darmstadt) bestimmt.

Nach dem Schlüpfen wurden die Larven in 2 L-Becken (Aquarienwasser plus Schadstoff) gesetzt, um genug Platz für ein zufriedenstellendes Wachstum bei gleichzeitig optimaler Futtermittellieferung zu gewährleisten. Etwa 8 Tage nachdem die letzten Larven des jeweiligen Versuchsansatz geschlüpft waren, wurden sie in 55 L-Aquarien (zwischen 40-70 Individuen /Aquarium) gesetzt. In dieser Anlage (Abb. 5) erfolgte die Exposition im Durchfluss. Dazu wurde über eine Regeleinheit (Rotameter GAGL 54, Yokogawa, Wehr) aufbereitetes Aquarienwasser in die Becken geleitet (2 L/h). Gleichzeitig wurde die entsprechende Schadstoffmenge (50 ml/h) aus Vorratsflaschen mit Hilfe einer Perfusionspumpe M 312 (Gilson, Villier-le-Bel, Frankreich) in die Aquarien gepumpt. In die Abdeckungen der Becken waren zugespitzte Glaszylinder eingehängt, welche an der Spitze aufgebohrt waren, und in denen sich aufbereitetes Aquarienwasser und Schadstoff mischen konnten. Die Aquarien standen auf Heizmatten (Pet-Mat, Fa. Rebie, Bielefeld), die über einen Temperaturfühler und ein Thermostat (Biotherm 2000, Fa. Rebie, Bielefeld) die Temperatur konstant bei 25 °C hielten. Die Aquarien wurden mit Hilfe eines Ausströmers belüftet.

Die Rotameter wurden alle drei Tage, die Pumpen wöchentlich geeicht. Die Reinigung der Becken von Algen erfolgte mindestens einmal in der Woche.

Die Tiere verblieben bis zur Geschlechtsreife in der Versuchsanlage. Hieraus erfolgte auch die Eientnahme für Nachzucht (F₂-Generation) und Early Life Stage-Tests.

Die F₂-Generation wurde zunächst bis 8 Tage nach dem Schlüpfen unter identischen Bedingungen wie die F₁-Generation gehalten. Danach wurden sie aus Platzgründen statisch in 30 L-Aquarien gehalten. Bei diesen Becken wurde alle 2 Wochen 2/3 der Schadstoffmenge ausgewechselt. Auch die F₂-Generation wurde bis zur Geschlechtsreife aufgezogen.

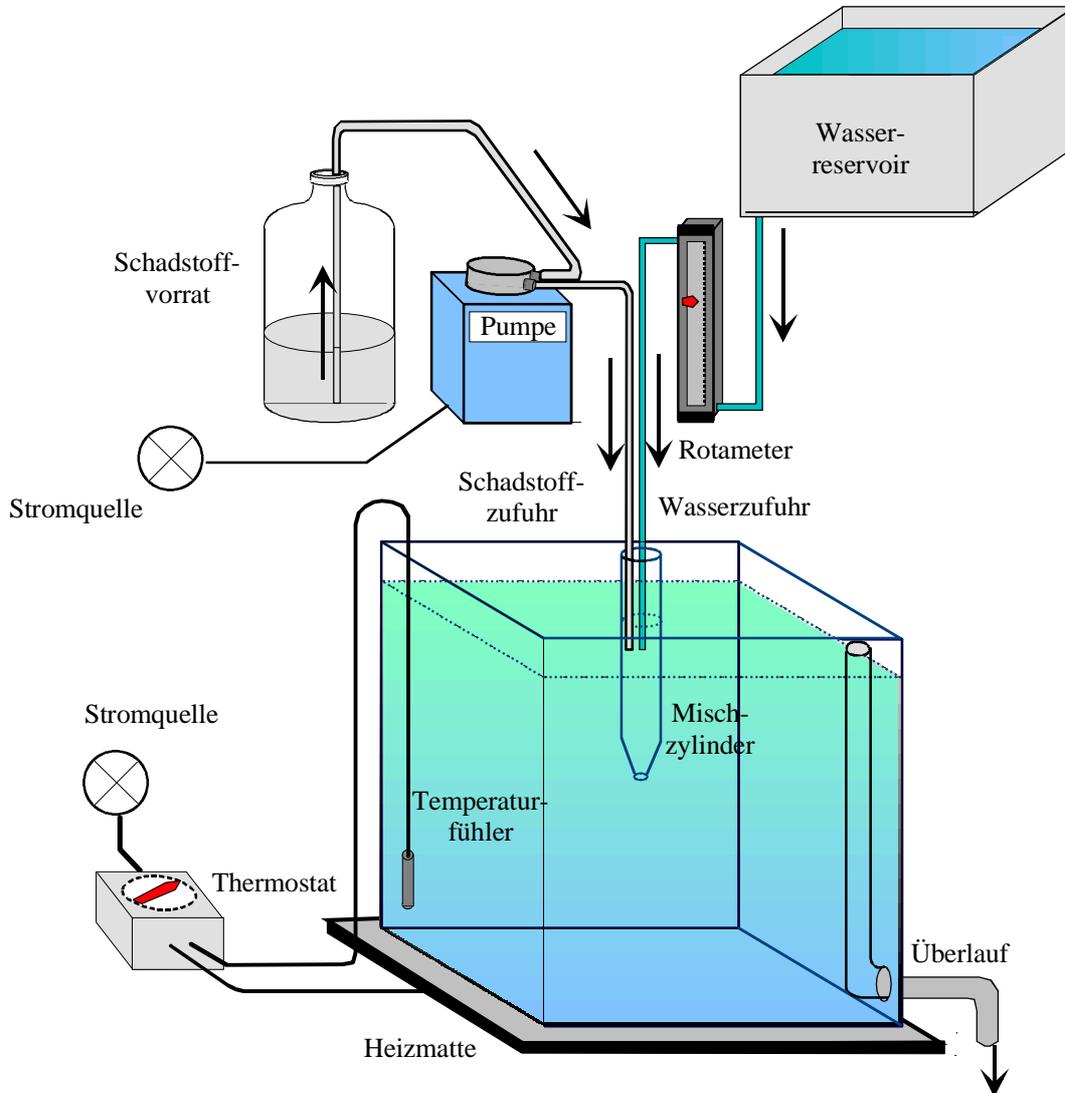


Abb. 5: Schematischer Aufbau der Versuchsanlage für die Life Cycle-Tests mit dem Medaka (*Oryzias latipes*).

Die Larven wurden mit Staubfutter AZ-100J (Tetra, Melle) und 2-3 Tage nach dem Schlüpfen zusätzlich mit Naupliuslarven des Salinenkrebses (*Artemia salina*) gefüttert. Nach dem Umsetzen der Fische in die großen Aquarien erhielten sie zweimal täglich zwischen 5-10 ml/Becken Salinenkrebslarven bzw. TetraminTM Flockenfutter (Tetra, Melle).

Als Nahrungsergänzung wurden die Medakas während des Life Cycle-Experiments mit Nonylphenol etwa zweimal wöchentlich mit einer Ration blanchiertem und püriertem Spinat gefüttert.

Für die Anzucht der Salinenkrebse wurden etwa 5 Eßlöffel der Cysten auf 5 L künstliches Meerwasser gegeben. Diese wurden 1-2 Tage unter starker Belüftung bei etwa 25 °C gehalten. Über einen Scheidetrichter wurden die geschlüpften Larven von den leeren Eihüllen getrennt, abgesiebt und verfüttert.

Early Life Stage-Test

Die Untersuchung der Auswirkung einer Schadstoffbelastung auf die Embryonalentwicklung erfolgte jeweils parallel mit exponierten Eiern von belasteten und unbelasteten (Wasserkontrollen) Elterntieren der F₁- bzw. F₂-Generation, da nur so Einflüsse durch einen unterschiedlichen Ernährungszustand der Tiere ausgeschlossen werden konnte. Um die Auslese der unbefruchteten Eier zu erleichtern, wurden die Eiklumpen abgestreift und eine Nacht einzeln in 24-Well-Platten (Greiner, Sohlingen) in 2 ml Schadstoff/Well überführt. Die Eier wurden am nächsten Tag vereinzelt, unbefruchtete Eier verworfen und in Petrischalen überführt. Aus den so gewonnenen Werten wurde auch die Befruchtungs- sowie die Reproduktionsrate (Anzahl Eier/Weibchen) ermittelt.

Tab. 5: Parameter der Embryonalentwicklung bei *O. latipes*. Die grau unterlegten Parameter konnten beobachtet werden.

Tag	Stunde	Entwicklungsparameter
1.	0	Eier abgestreift
2.	23	frühe Neurula
	26	späte Neurula
	33	Somitenbildung
3.	36	Augenbecher und Herzanlagen
	40	Linsen- und Oocystenbildung
	46	Herzschlag (40-60/min)
	52	Einsetzen der Blutzirkulation
	54	Spontanbewegung
	56	Pigmentierung der Retina, Herzschlag 100-120/min
4.	62	Pektoralflossenanlage
	74	Ausbildung von Hämoglobin (rosa Blut), Herzschlag 120/min
5.	102	Chromatophoren entlang des Schwanzes
6.	121	Ausbildung der Schwanzflosse
7.	128	Leberentwicklung
	144	Ausbildung der Schwimmblase
8.	168	Gelbfärbung
9.	200	Milz und Mundspalte sichtbar
10.		
11.	264	Larve schlüpft

Die Embryonalentwicklung wurde anhand dem in Tab. 5 beschriebenen Entwicklungsverlauf (Matsui 1949) beobachtet und dokumentiert.

Befruchtungsrate

Die Ermittlung von Befruchtungsrate und Reproduktionserfolg in der F₁- wie auch in der F₂-Generation erfolgte während des Early Life Stage-Experiments. Die Vorgehensweise wurde dort beschrieben.

LC 50-Test

Zu diesem Zweck wurden je 32 etwa 5 Tage alte Larven in 25, 50, 100, 200, 300, 400 und 500 µg/L Nonylphenol gesetzt. Die Becken wurden zweimal täglich überprüft und tote Larven entfernt. Die Exposition erstreckte sich insgesamt über 84 Stunden.

Präparation der Fische

Zur Geschlechtsbestimmung und Untersuchung der inneren Organe wurden die Fische unmittelbar vor der Fixierung aus den Aquarien entnommen und in einer gesättigten Lösung von Ethyl-4-aminobenzoat (Benzocain) betäubt. Gewicht und Körperlänge wurden bestimmt. Alle Fixierlösungen wurden auf 4°C temperiert. Fische, denen nur die Leber für eine mRNA-Analyse entnommen wurde wurden nicht perfundiert. Nach Entnahme der Leber wurden die Fische in toto in 4 % Formalin fixiert und zur Untersuchung der Gonaden zum Projektparter nach Wielenbach geschickt. Bei allen Fischen wurde makroskopisch das Geschlecht bestimmt.

Zusätzlich wurden je 4 Männchen und Weibchen für die Elektronenmikroskopie vorbereitet (siehe 2.6)

2.7.3 Versuchsaufbau und Tierhaltung bei Belastung mit Octylphenol bzw. DHEA im Life Cycle-Test

Versuchsaufbau und Vorgehensweise werden hier nur insofern beschrieben, wie sie von den Material und Methoden des Life Cycle-Experiments mit Nonylphenol abweichen. So wurden sowohl Rotameter wie auch die Pumpen in diesen Life Cycle-Tests alle 3 Tage geeicht.

Early Life Stage-Test

In Abweichung zum Life Cycle-Experiment mit Nonylphenol wurden bei den Life Cycle-Experimenten mit Octylphenol und DHEA die Brutpaare in Gruppen von je 2 Männchen und 3 Weibchen gehalten. Die Eientnahme für den Early Life Stage-Test erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen, an denen die Gelege in 24-Well-Platten gesammelt und nach einem Tag ausgelesen, vereinzelt und in Petrischalen überführt wurden. Die Eier wurden bis zum Schlüpfen beobachtet und Sterblichkeit, Missbildungen sowie Dauer bis zum Schlüpfen ermittelt.

Befruchtungsrate

Zur Ermittlung der Befruchtungsrate wurden die Weibchen jeder Versuchsgruppe mindestens eine Woche täglich abgestreift; die Eier in 24-Well Platten überführt, über Nacht im Brutschrank gehalten und am nächsten Tag ausgezählt. Die Hälterung der Tiere erfolgte auch hier in Brutpaaren zu je 3 Weibchen und 2 Männchen.

Kreuzungsexperimente

Für eine Beurteilung der geschlechtsspezifischen Einschränkungen der Reproduktivität nach Belastung mit Octylphenol bzw. DHEA wurden Kreuzungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Brutpaare aus belasteten Männchen und unbelasteten Weibchen sowie unbelasteten Männchen und belasteten Weibchen zusammengestellt. Auch in diesem Experiment wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen die Weibchen abgestreift, Gelegegröße und Befruchtungsrate ermittelt und Early Life Stage-Tests durchgeführt.

Histologische Untersuchungen

Zur Untersuchung der Gonaden wurden die Medakas aus den Life Cycle-Experimenten mit Octylphenol und DHEA betäubt und anschließend in Bouin (71 % gesättigte Pikrinsäurelösung, 24 % Formol, 5 % Eisessig) *in toto* fixiert.

Nach einer Fixierzeit von mind. 24 h wurden die Präparate für jeweils eine Stunde so lange in 70 % igem Alkohol plus wenigen Tropfen NaOH gewaschen, bis sich der Alkohol nicht mehr gelb färbte. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80 %, 90 %, 96 % EtOH für je 3 x 20 min und 100 % Isopropanol für 2 x 30 min) entwässert. Danach wurden sie in Methylbenzoat überführt (1. Inkubation bis zum Absinken der Objekte, 2. Inkubation über Nacht, 3. Inkubation für mind. 3 h), in Paraffin überführt (1. Inkubation über Nacht, 2. Inkubation für mind. 3 h) und anschließend in Paraffin eingebettet.

Aus den so gewonnenen Paraffinblöckchen wurden Längsschnitte der Gonaden von 5-8 μm Dicke angefertigt. Diese wurden nach Goldner (Romeis, 1989) gefärbt und mit einem Olympus-CK2 Photomikroskop (Olympus, Hamburg) ausgewertet.

2.7 Elektronenmikroskopie

Unmittelbar vor der Fixierung wurden die Tiere aus dem Aquarium entnommen und in einer gesättigten Lösung aus Ethyl-4-aminobenzoat (Benzocain) betäubt. Alle Fixierlösungen wurden auf 4 °C temperiert. Nach Eröffnung der Körperhöhle vor dem Diaphragma wurden die Tiere *in situ* über den Ventrikel mit Perfusionsfixans I (1,5 % Glutardialdehyd und 1,5 % Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer; pH 7,6) perfundiert. Zur weiteren Bearbeitung wurden Leberproben mit einer Kantenlänge von < 0,5 cm entnommen und in Perfusionsfixans II (2,5 % Glutardialdehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,6) mit 4 % PVP und 0,05 % CaCl_2) überführt. In dieser Lösung verblieben sie über Nacht. Nach dreimaligem kurzen Spülen in 0,1 M Cacodylatpuffer wurden alle Proben 1 h in reduziertem Osmium (1:1 Gemisch aus 2 % OsO_4 und 3 % $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6$), Karnovski, 1971) bei 4 °C inkubiert. Anschließend

wurden die Proben je dreimal in 0,1 M Cacodylat- und 0,05 M Maleatpuffer (pH 5,2) gespült und über Nacht bei 4 °C in 1% Uranylacetat in 0,05 % Maleatpuffer *en bloc* kontrastiert.

Nach der Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe (75 %, 85 %, 95 %, 100 % EtOH für je 3 x 10 min) wurden die Gewebestücke in Spurr (Spurr 1969) eingebettet. 200 nm dicke Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser auf einem Reichert OM-U 2 Ultramikrotom hergestellt, 30 min mit Bleicitrat kontrastiert und in einem EM 10C Elektronenmikroskop (Zeiss, Jena) ausgewertet.

Zur Analyse von Veränderungen in der Organisation des Leberparenchyms und der Hepatocyten wurden Semidünnschnitte mit einer Dicke von 0,3 bis 0,5 µm angefertigt und nach der Methode von Singh (1964) versilbert, wodurch Glykogenareale auf den Schnitten dunkelbraun bis schwarz dargestellt wurden. In den meisten Fällen erfolgte eine Gegenfärbung nach Richardson (1960). Die lichtmikroskopischen Schnitte wurden an einem Olympus-CK2 Photomikroskop (Olympus, Hamburg) ausgewertet.

DAB-Inkubation: Zum Nachweis der Leberperoxisomen wurden die Leberstückchen nach der Glutaraldehydfixierung in alkalischem 3,3'-Diaminobenzidinmedium (DAB) nach Le Hir et al. (1979) inkubiert (Nachweis der Katalase = Wasserstoffperoxid-Oxidoreduktase). Die Proben wurden hierzu 90 min in 10 mM Theorell-Stenhagen-Puffer bei pH 10 mit 5 mM Diaminobenzidin und 0,5 % H₂O₂ bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben in Osmium (s.o.) nachfixiert, entwässert und eingebettet.

Vibratomierung: Zur Verringerung der Diffusionsstrecke wurden die etwas größeren Leberproben von Karpfen und Forelle vor der Überführung in Perfusionsfixans II mit 60 °C warmen Agar auf einem Korkwürfel fixiert. Mit dem Vibratom (TPI, St. Louis, USA) wurden Segmente von 40-80 µm Dicke hergestellt und in 4 °C kaltem 0,15 M Cacodylatpuffer (pH 7,6) aufgefangen.

Elektronenmikroskopische Auswertung: Es wurden mindestens zwei Männchen und zwei Weibchen einer Konzentration untersucht. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ anhand der Mittelwerte aus mindestens 15 untersuchten Zellen eines Schnitts.

2.8. Vitellogeninmessung im Plasma mit Hilfe eines kompetitiven ELISA (Enzymelinked immunosorbent Assay)

2.8.1 Aufreinigung des Vitellogenins aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Die Vitellogenaufreinigung erfolgte durch Herrn Markus Islinger mit Hilfe einer FPLC-Anlage aus mit 17β-Estradiol induzierten Regenbogenforellen (Islinger 1996).

2.8.2 Antikörper gegen Regenbogenforellen-Vitellogenin

Der Antikörper gegen Regenbogenforellen-Vitellogenin wurde ebenfalls von Herrn Markus Islinger hergestellt. Details zur Antikörperherstellung sind der Diplomarbeit von Markus Islinger (1996) zu entnehmen.

2.8.3 Plasmagewinnung

Nach Betäubung mit Benzocain wurde den Fischen über die Schwanzvene Blut entnommen. Als Gerinnungshemmer wurde dem Blut 10 % einer Citrat-Dextrose-Lösung (8 g Zitronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \times H_2O$), 22 g Natriumcitrat Dihydrat $C_8H_6O_{10}Na_3 \times H_2O$ und 24,5 g Dextrose auf 1L Aqua bidest) sowie 404 μ l/ml Aprotinin beigemischt. Das Blut wurde in einer Heräus-Kühlzentrifuge 15' bei 2500 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -70 °C.

2.8.4 Reagenzien und Lösungen:

Phosphate-buffered saline (PBS): 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g KH_2PO_4 ; 1,68 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ auf 1 L Aqua bidest.

PBS-Tween Waschpuffer (pH 7,2): PBS + 0,1 % Tween 20 (Sigma, Deisenhofen)

Blockpuffer (pH 7,2): 2 % Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma, Deisenhofen) in PBS

Beschichtungspuffer: 5,3 g Na_2CO_3 auf 1 L Aqua bidest, pH-Wert mit $NaHCO_3$ auf 9,6 einstellen.

Färbelösung: 0,05 g 2,2'-Azino-diethylbenzthiazolinsulfonat (6), Ammoniumsalz (ABTS); 2,72 g Na-Acetat-3-Hydrat; 1,42 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ auf 200 ml Aqua bidest, pH-Wert mit Essigsäure auf 4,2 einstellen; Lagerung portionsweise bei -20 °C. Unmittelbar vor Färbebeginn 10 μ l 30 %iges H_2O_2 /10 ml Färbelösung zusetzen.

2.8.5 Arbeitsprotokoll kompetitiver ELISA

Plattenbeschichtung: In die inneren 60 Wells der 96-Well-Platte werden je 100 μ l Vitellogeninlösung (100 ng/ml in Beschichtungspuffer) pipettiert.

Vorinkubation des Standards: Der Vitellogeninstandard wurde von 1000 ng/ml bis 0,45 ng/ml in einer 1:3 Verdünnungsreihe angesetzt. Die Plasmaproben von Männchen wurden 1:3, das der Weibchen 1:300 vorverdünnt und dann in einer Verdünnungsreihe von 1:3 bis 1:81 verdünnt. Die Verdünnungen wurden mit Antiserum-Lösung vom Kaninchen durchgeführt (Endverdünnung 1:25000 in PBS) und über Nacht bei 4° C inkubiert.

Waschen der ELISA-Platten: Die Wells wurden 3 x mit 200 μ l PBS-Tween gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Platten auf saugfähigem Papier gründlich ausgeklopft, um die Waschflüssigkeit gründlich zu entfernen. Der 3. Waschschrift wurde als „Soaking step“ genutzt, d. h., die Waschlösung wurde 5 min in den Wells belassen.

Blockieren der unspezifischen Adsorption in den ELISA-Platten: Freie Bindungsstellen wurden mit 2 % BSA-Lösung abgesättigt. Die Wells wurden mit 200 µl Blocking-Lösung befüllt und in einer feuchten Kammer für 90 min bei 37 °C inkubiert.

Aktivierung der Proben und des Standards: Die Proben- und Standardverdünnungen wurden nach der Über-Nacht-Inkubation für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert.

Waschen der ELISA-Platten: s.o.

Inkubation mit spezifischem Antikörper: 200 µl jeder Vorinkubationslösung wurde in 3 Replika in die ELISA-Platten gegeben. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

Waschen der ELISA-Platten: s.o.

Inkubation des sekundären Antikörpers: 100 µl/Well der sekundären Antikörperlösung (Ziege anti Kaninchen-IgG (H+L) Peroxidase-konjugiert (Bio-Rad Laboratories, München) 1:3000 in PBS) wurde in die ELISA-Platten pipettiert und in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 45 min inkubiert.

Waschen der ELISA-Platten: s.o.

Substratreaktion: Die Platten wurden mit 200 µl Färbelösung pro Well für 30 min im Dunkel bei Zimmertemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 415 nm mit dem Microtiterplattenreader (SLT, Crailsheim). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des E.A.S.Y.base-Programm (SLT, Crailsheim) und Microsoft Excel.

2.9 Western Blot

Die Entnahme des Karpfenplasmas erfolgte nach der unter 2.7.1 beschriebenen Methode.

Für den Western Blot wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Karpfenvitellogenin verwendet, der uns freundlicherweise von Prof. Dr. J. B. Sumpter vom Department of Biology and Biochemistry der Brunel University in Uxbridge, Middlesex (U.K.) zur Verfügung gestellt wurde.

Der Proteingehalt des Karpfenplasmas wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Für den Blot wurde ein Plasmaäquivalent zu 15 µg Protein mit dem gleichen Volumen Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8; 40 % Glycerin; 0,3 % DTT; 4% SDS; 0,025 % Bromphenolblau) verdünnt und 10 min bei 100 °C denaturiert. Für das SDS-Page-Gel wurde ein 3,8 % iges Sammelgel (2,5 ml Sammelgelpuffer (0,5 M TRIS, 0,4 % SDS, pH 6,8), 6,2 ml Aqua bidest, 1,3 ml Acrylamid/Bisacryllösung (30 %), 0,1 ml 10 % TEMED, 0,1 ml 10 % APS-Lösung) und ein 10 % iges Trenngel (7,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M TRIS, 0,4 % SDS, pH 8,8), 12,5 ml Aqua bidest, 10 ml Acrylamid/Bisacryllösung (30 %), 0,3 ml 10 % TEMED, 0,3 ml 10 % APS-Lösung) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde mit 15 mA pro Gel durchgeführt. Danach wurden die Gele, Whatman-Papier und aktivierte (Aktivierung der Membran durch Inkubation in Methanol für 30 s) Nitrocellulosemembran (Immobilon[®], Serva, Heidelberg) in Blotpuffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % Methanol) überführt. Das Blotten erfolgte mit einem Semi-Dry Transfer-cell Trans Blot SD (Fa. Biorad, München) für 75 min mit 0,8 mA/cm².

Die Membranen wurden danach 3 x 10 min in PBS-Puffer (PBS, 0,05 % Tween 20) gewaschen und anschließend mit 5 % fettfreiem Milchpulver in PBS-Puffer 2 h geblockt. Die darauffolgende Inkubation mit dem 1. Antikörper (Antikörper gegen Karpfenvitellogenin) wurde in einer Verdünnung von 1:2500 für 1 h durchgeführt, danach folgten 3 zehnmütige Waschschrirte in PBS-Puffer. Die Inkubationszeit des 2. Horseradish-Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (Verdünnung 1:15000 in 1 % Milchpulver) betrug ebenfalls 1 h. Die Fluoreszenzreaktion des 2. Antikörpers wurde mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham-Buchler, Little Chalfont, England) durchgeführt. Dazu wurden die Membranen 1 min lang mit einem 1:1 Gemisch der beiden Komponenten des Kits behandelt und anschließend in Folie gepackt. Die Detektion der Fluoreszenzreaktion geschah mit Hilfe von Röntgenfilm-Platten (Kodak BioMax Light 1, Sigma, Deisenhofen) welche je nach Intensität der Reaktion für 30-60 s auf die Membranen gelegt und anschließend entwickelt wurden.

Die verschiedenen Proteinbanden auf den Membranen wurden mit einer Coomassie-Blue-Färbung (0,5 g Coomassie-Blue, 400 ml Methanol, 500 ml H₂O, 100 ml Essigsäure) dargestellt und mit Entfärbelösung (100 ml Essigsäure, 400 ml Methanol, 500 ml H₂O) differenziert. Der entwickelte Röntgenfilm wurde eingescannt und die Reaktionsintensität der Banden wurden mit Hilfe des E.A.S.Y Programms von Herolab (Wiesloch) ausgewertet.

Besonderer Wert wurde dabei auf die Ermittlung des Induktionsfaktors (optische Dichte Banden belastet/optische Dichte Kontrollbanden), also auf die relative Zunahme der Reaktionsstärke im Vergleich zur Kontrolle, gelegt. Die Ergebnisse wurden als Induktionsfaktor angegeben, da viele der Plasmaproben keine charakteristische Vitellogeninbande, sondern nur Vitellogeninabbaubanden zeigten. Deshalb war eine genaue, quantitative Auswertung des Western Blots nicht möglich; es konnte nur die Gesamtfläche der Reaktion ermittelt werden.

2.10 Messung der Vitellogenin-mRNA-Induktion mit RT-PCR

2.10.1 RNA-Isolation

Die Messung der Vitellogenin-mRNA-Induktion erfolgte aus den Lebern von je 3 männlichen Medakas pro Versuchsgruppe und wurde aufgrund der geringen RNA-Mengen mit dem RNeasy Total RNA-System (Quiagen, Hilden) durchgeführt; es handelte sich hierbei um ein adsorptionschromatographisches, auf Silica-Gel Membranen basierendes Trennverfahren, das durch kurze Isolationszeit die Aufarbeitung einer großen Probenzahl ermöglicht. Einzelnen Organe wurden mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Polytron, Kinematica, Littau/Luzern, Schweiz) im Guanidinoisothiocyanat-haltigen Lysepuffer des Herstellers homogenisiert, ohne die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben aufzutauen. Die weitere Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Reinheit und RNA-Gehalt aller RNA-Proben wurden photometrisch bei 280/260 nm bestimmt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C in RNase freiem Wasser bis zur weiteren Verwendung.

2.10.2 Semiquantitative RT-PCR of M-Vg0.5

Für die semiquantitative RT-PCR der Vitellogenin-mRNA wurden spezifische Primer zu einer 500 bp Region des Medaka-Vitellogenins (M-Vg0.5+: 5'-GAC CTG GAA GCA TTC TGG AG-3', M-Vg0.5-: 5'-TCT GAT TGG CAG AGA TGC AG-3', Gen Bank, AccN^o: AF 268284) erzeugt. Zusätzlich wurden Primer, der spezifisch für eine 0.3 kb Region des Elongationsfactors 1 α (M-ELF0.3+: 5'-AGC GAC AAG ATG AGC TGG TT-3', M-ELF0.3-: 5'-GGG CAC AGC TTC TGG TAA AG-3') des Medakas als interner Standard gewählt (GenBank AccN^o: AB013606). Für die reverse Transcription (50 mM KCl, 10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2,5 U/ μ l MuLV, 1 mM dNTPs, 1 U/ μ l RNase Inhibitor, 2,5 μ M Oligo-d(T)₁₆, 50 ng/ μ l total RNA) wurde ein Primer Annealing Schritt von 10 min bei Raumtemperatur, ein Transkriptionsschritt von 25 min bei 42 °C und ein Enzym-Denaturierungsschritt von 5 min bei 95 °C durchgeführt. Die PCR-Amplifikation wurde in einem 30 Zyklen umfassenden Programm mit 95 °C/30 sec für die Denaturierung, 57 °C/30 sec für die Anlagerung der Primer und 72 °C/1 min zur DNA-Amplifikation mit 1.5 mM MgCl₂ und 2.5 U/100 μ L Taq-Polymerase. Die PCR-Proben wurden auf einem 1.5 % Agarosegel getrennt. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Gele wurden densitometrisch mit der E.A.S.Y. Win 32 Software (Herolab, Wiesloch) analysiert.

3. Auswirkungen einer Belastung von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit Nonylphenol während der Juvenilzeit und Laichreife

Zusammenfassung: Ziel dieser Untersuchung war es, eine Korrelation zwischen dem Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts und Veränderungen in der Ultrastruktur mit Nonylphenol bzw. 17α -Ethinylestradiol (EE2) belasteter juveniler und laichbereiter Regenbogenforellen herzustellen. Sowohl bei juvenilen als auch bei adulten Männchen konnte bereits ab einer Konzentration von $1\ \mu\text{g/L}$ Nonylphenol ein signifikanter Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts beobachtet werden. Dabei waren die Induktionsfaktoren beider Versuchsgruppen nach Belastung mit Nonylphenol vergleichbar. Im Gegensatz dazu reagierten die adulten Männchen auf eine Belastung mit 17α -Ethinylestradiol mit einem etwa 40fach stärkerem Anstieg des Vitellogeningehalts als die juvenilen Tiere. Die Induktion der Vitellogeninsynthese fand ihre Entsprechung in der Ultrastruktur der Hepatocyten. Dabei waren die wichtigsten Veränderungen nach Belastung mit Nonylphenol in beiden Gruppen: (1) Zunahme der Menge des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) sowie eine regelmäßigere Organisation der rER-Zisternen in Stapeln, (2) Proliferation der Dictyosomen und Aktivitätszunahme des Golgi Apparates, (3) Erhöhung der Mitochondrienheterogenität. Zusätzlich konnte bei den adulten Regenbogenforellen eine Zunahme der Glykogenmenge, eine Vermehrung der lysosomalen Elemente und eine dosisabhängige Dilatation der rER-Zisternen beobachtet werden. Die juvenilen Versuchstiere zeigten neben einer Abnahme der Mitochondrienmenge auch eine progressive Fragmentierung der rER-Zisternen. Eine Belastung mit EE2 resultierte in beiden Versuchsgruppen außer in einer Mengenzunahme auch in einer verstärkten Fragmentierung und Dilatation des rER.

Diese Studie belegt einerseits, dass eine durch endokrine Belastung hervorgerufene Induktion der Vitellogeninsynthese ultrastrukturell mit einer Proliferation des Proteinbildungsapparates einhergeht, und andererseits, dass Regenbogenforellen sowohl geschlechtsspezifisch als auch abhängig von Alter und Reproduktionsstadium Unterschiede in ihrer Reaktion auf Nonylphenol und 17α -Ethinylestradiol zeigen.

3.1 Einleitung

Alkylphenoethoxylate (APE) finden eine breite Verwendung in Haushalt und Industrie. Die am häufigsten verwendete Gruppe dieser Verbindungen ist die der Nonylphenoethoxylate. Sie repräsentieren etwa 90 % der Gesamtproduktion an APEs (Naylor et al. 1992, Ahel et al. 1996). Die Nonylphenolproduktion liegt derzeit bei 270.000 t/a (Hawlerak et al. 1999). Von dieser Menge werden 70-80 % zu Nonylphenoethoxylaten umgesetzt. Diese Nonylphenoethoxylate finden als Detergenzien, Weichmacher und Emulgatoren in zahlreichen Industrieanwendungen und in Haushaltsreinigern Verwendung (Arukwe et al. 2000). Das nicht umgesetzte Nonylphenol wird in weniger gewässerrelevanten Anwendungen der Mineralöl- und Harzindustrie verbraucht (Lindt & Schade 1997). Aufgrund der hohen Produktions- und Verbrauchszahlen sind Nonylphenol und Nonylphenoethoxylate ubiquitär in der aquatischen Umwelt zu finden. Die Hauptquelle der nonylphenolhaltigen Verbindungen in der Umwelt ist ihre Verwendung als nichtionische Tenside (Etnier 1986), von denen 1994 jährlich mehr

als 360.000 t in Westeuropa, USA und Japan verwendet wurden (Ahel et al. 1994). Nonylphenol ist von der Europäischen Gemeinschaft als umweltgefährdende Substanz eingestuft worden (Ahel & Giger 1993, Ekelund et al. 1990). Obwohl dies in vielen europäischen Ländern zu einem Verzicht auf Nonylphenolethoxylate in Haushaltsreinigern geführt hat, sind diese Substanzen weltweit oft in endokrin wirksamen Dosen in Gewässern anzutreffen. Normalerweise übersteigt die Nonylphenolkonzentration in Flüssen und Seen selten 10 µg/L (Ahel et al. 1987, Bennie et al. 1997, Blackburn & Waldock 1995), jedoch konnten in Gewässern mit einer hohen Fracht an Abläufen von Industrie und Kläranlagen zeitweise Konzentrationen von bis zu 1000 µg/L gemessen werden (Warhurst 1995). Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von Nonylphenol sind auch große Mengen im Sediment von Flüssen und Seen zu finden; in einigen Flüssen der Vereinigten Staaten konnten in der Vergangenheit Werte von bis zu 3 mg/kg Sediment gemessen werden (Naylor et al. 1992).

Die endokrine Wirkung von Nonylphenol ist seit langem bekannt. Soto et al. (1991) entdeckten bei MCF7-Zellen eine östrogene Wirkung der verwendeten nonylphenolhaltigen Zentrifugenröhrchen. In den vergangenen Jahren folgten zahlreiche Untersuchungen über biologische Abbaubarkeit (Ahel et al. 1994, Manzano et al. 1998), Bioakkumulation (Ahel et al. 1993 a, Heinis et al. 1999, Lewis & Lech 1996, Tsuda et al. 2000) und Metabolismus (Arukwe et al. 2000, Coldham et al. 1998, Charuk et al. 1998, Lee et al. 1998, Mehldahl et al. 1996, Thibaut et al. 1998) von Nonylphenol sowie über die adversen Effekte von Nonylphenol auf Reproduktionserfolg und Überleben von *Xiphorus maculatus* (Kinneberg et al. 2000) und das Auftreten von Zwittergonaden beim Medaka (Gray & Metcalfe 1997). Ein Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts bei männlichen Regenbogenforellen konnte ab einer Belastung mit 10 µg/L Nonylphenol beobachtet werden (Jobling et al. 1996)

Ziel dieser Studie war eine Untersuchung zwischen dem nonylphenol- bzw. EE2-induzierten Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts und den ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber von Regenbogenforellen in unterschiedlichen Lebensstadien.

3.2 Messung des Plasma-Vitellogenin-Gehalts adulter Regenbogenforellen während der Laichreife nach Exposition gegenüber Nonylphenol

Schon ab Konzentrationen ≥ 1 µg/L Nonylphenol war bei den männlichen Regenbogenforellen ein signifikanter Unterschied zur Wasserkontrolle zu beobachten (Abb. 6). Während die mit 10 µg/L Nonylphenol behandelten Männchen einen rund 10 % höheren Vitellogeningehalt als die Kontrolltiere aufwiesen, lag der Vitellogeningehalt bei den mit 1 µg/L Nonylphenol behandelten Männchen sogar noch etwas höher.

Der direkte Vergleich der untersuchten Tiere des Ethinylestradiolversuchs zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen den Geschlechtern während der Laichreife (Abb. 7). Auffällig war die starke Varianz in der Vg-Induktion innerhalb der Kontrolltiere. Der Vitellogeningehalt im Plasma lag bei den Weibchen um das etwa 130.000fache höher als bei den Männchen. Dagegen entspricht die Vitellogenininduktion bei den mit EE2 behandelten Männchen etwa der der nicht induzierten Weibchen.

3. Forellen Nonylphenol

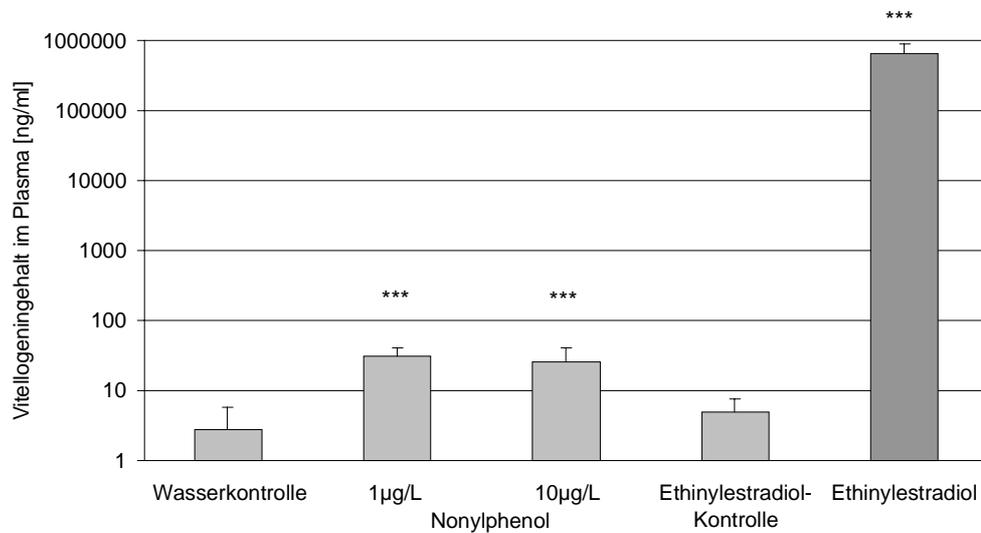


Abb. 6: Vitellogeningehalt im Plasma männlicher Regenbogenforellen nach Exposition gegenüber Nonylphenol bzw. Ethinylestradiol. Signifikanzberechnung gegenüber Kontrolle gemäß U-Test nach Mann-Whitney: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

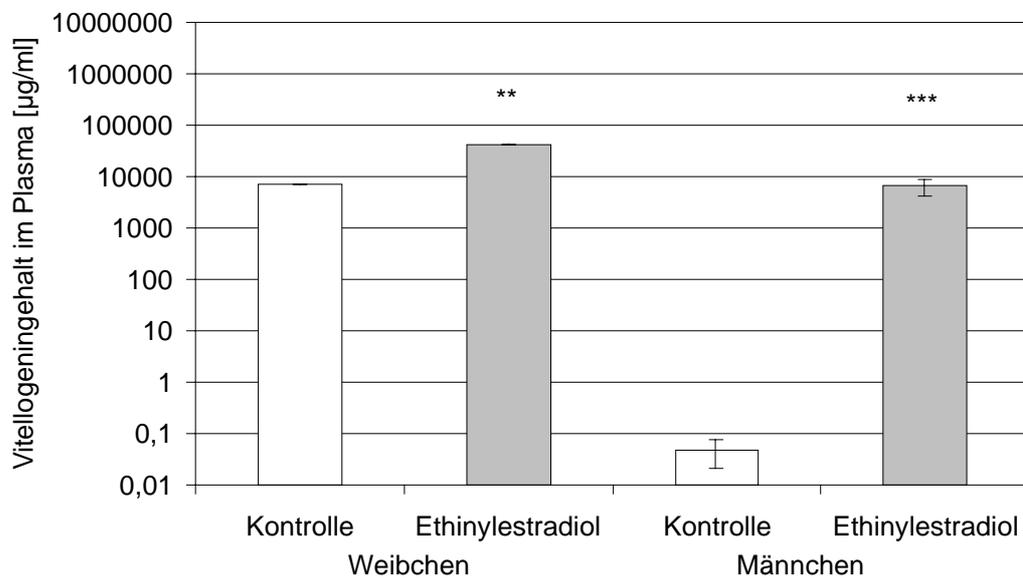


Abb. 7: Vitellogeningehalt im Plasma männlicher und weiblicher Regenbogenforellen nach Belastung mit Ethinylestradiol. Signifikanz gemäß U-Test nach Mann-Whitney: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

Dabei zeigte sich bei den Männchen eine starke Schwankung der Einzelwerte (= hohe Standardabweichung).

Auch bei den Weibchen fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Ethinylestradiol behandelten und den Kontrolltieren (Abb. 8). Hier lagen die Werte der induzierten Weibchen etwa 6 mal höher als bei den Kontrolltieren.

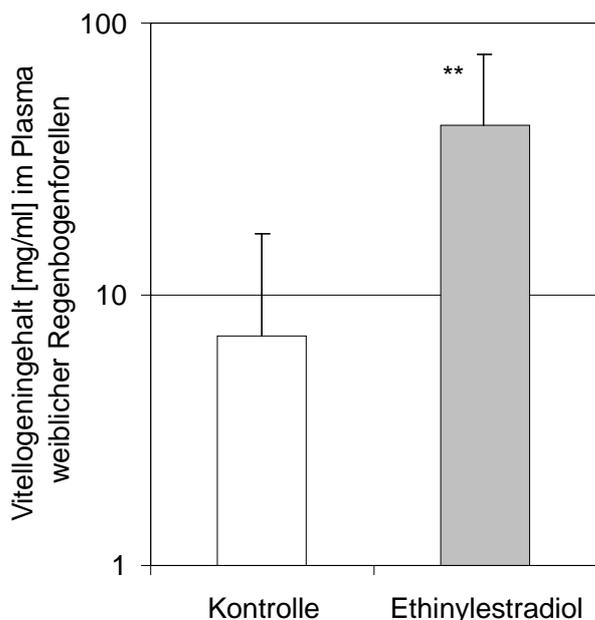


Abb. 8: Vitellogeningehalt im Plasma weiblicher Regenbogenforellen nach Belastung mit Ethinylestradiol. Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle gemäß U-Test nach Mann-Whitney: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

3.3 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber adulter Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) nach intermittierender Belastung mit Nonylphenol

Aufgrund der starken Unterschiede zwischen den Wasserkontrollen aus dem Nonylphenol- und Ethinylestradiolversuch wurden diese getrennt behandelt.

Da bei laichbereiten Regenbogenforellen ein stark ausgeprägter Sexualdimorphismus in der Leber vorliegt, wurden Männchen und Weibchen im folgenden weitgehend separat betrachtet. Die ultrastrukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsansätzen sind in Tab. 6 und 7 zusammengefasst und quantifiziert.

Wasserkontrollen

Der Sexualdimorphismus manifestierte sich bei den Männchen in deutlich vorhandenen Glykogenspeichern (Abb. 9), während bei den weiblichen Kontrolltieren die zentralen organellenhaltigen Cytoplasmaareale deutlich mehr Raum einnahmen (Abb. 10). Die Glykogenfelder waren hier auf ganz wenige scharf umrissene Bereiche beschränkt, die nicht in jeder Zelle zu finden waren. Eine klare Trennung zwischen peripherem Speicherraum (Glykogen, durch Versilberung dunkel gefärbt) und innerem organellenhaltigem Cytoplasma (helle Bereiche im versilberten Semidünnschnitt) war beiden

3. Forellen Nonylphenol

Tab. 6: Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in der Leber Nonylphenol-exponierter weiblicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) während der Laichreife.

		Wasser- kontrolle	Nonylphenol		Ethinyl- estradiol- kontrolle	Ethinyl- estradiol
			1µg/L	10µg/L		
Intrazelluläre Gliederung		++	+++	++	+++	+++
Parenchymheterogenität		++	++	++/+++	+	+++
Kern	Regelmäßige Form	+	+	+	++	+
	Zentrale Lage	+	+	++	+	+
	Heterochromatin	++	+++	+ / +++	++	++
	Nucleolus	+	++	+	+ / +++	+
Mitochondrien	Menge	++	++	++	++ / +++	++
	Größe	++	+ / ++	++	++	++
	Heterogenität	+	++	++ / +++	++ / +++	++
	Intramitoch. Granula	-	+	-	-	-
Peroxisomen	Menge	+	+	+	+	+
	Größe	+	+	+	+	+
	Heterogenität	+	+	+	+ / ++	+
rER	Menge	++ / +++	+++	+++	+++	+++
	Stapel	++	+++	++ / +++	++ / +++	+++
	Paral. Zisternen	++	+++	++ / +++	++ / +++	+++
	Fragmentierung	++	++ / +++	++	+ / ++	+++
	Dilatation	++	++	++ / +++	+	++
sER	Menge	+	+	+	+	+
	Lage im Glykogen verteilt	+	+	+	-	+
		++	+	++	+	+
Golgi	Menge	++	++	+++	+ / ++	+++
	Zisternen	+	++	++	+ / ++	++
	Fenestrierung	++	+	+	- / +	+
	Aktivität	++	+++	+++	+	++
Lysosomen	Menge	+++	++	++	+	++
	Primäre Lysosomen	+	+ / ++	+	+	+
	Sekundäre Lysosom.	++	+ / ++	++	- / +	+
	Tertiäre Lysosomen	++	- / +	+ / ++	- / ++	+
	Myelin	++	++	+	+	+
	Autophagosomen	+	+	-	-	-
	Vakuolen	++	++	+	+	+
Lipid	Menge	+	+	-	-	-
	Lage im Glykogen	+	+	-	-	-
Glykogen	Menge	+ / -	+ / ++	++	++	+ / ++
	Part. Entspeicherung	++	+	+	+	+
Interzellularen	geschlossen	+++	+	+++	+++ / +++++	+++
	erweitert	+	++	+	+	+
Fremdzellen	Makrophagen	+	++	+	+ / -	+

- Merkmal fehlt

+ selten

++ Merkmal deutlich ausgeprägt

+++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt

++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden bzw. ausgeprägt

■ nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen

■ leichter Unterschied zu den Kontrollen

■ deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

3. Forellen Nonylphenol

Tab. 7: Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in der Leber Nonylphenol-exponierter männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) während der Laichreife.

		Wasser- kontrolle	Nonylphenol		Ethinyl- estradiol- kontrolle	Ethinyl- estradiol
			1µg/L	10µg/L		
Intrazelluläre Gliederung		++/+++	+++	+	++/+++	+
Parenchymheterogenität		+ / ++	+	+++	++	+++
Kern	Regelmäßige Form	+++	++	++	+++	+
	Zentrale Lage	-	-	+++	+++	+
	Heterochromatin	++/+++	++/+++	+	++	+
	Nucleolus	++	++	++	+	+
Mitochondrien	Menge	++/+++	++/+++	++	++	+++
	Größe	++	++	++	+++	+++
	Heterogenität	+	+	++/+++	+++	++
	Intramitoch. Granula	+	+	+	-	++
Peroxisomen	Menge	+	+	+	+	++
	Größe	+	+	+	+	++
	Heterogenität	+	+	+	+	+
rER	Menge	+ / ++	++	++/+++	++	+++
	Stapel	+ / ++	++	++/+++	+++	++
	Paral. Zisternen	++	+++	++/+++	++	++
	Fragmentierung	++	+	+++	+	+++
	Dilatation	+	++	++/+++	-	+++
sER	Menge	+	+	++	+	++
	Stapel	-	-	-	-	-
	Lage im Glykogen verteilt	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
Golgi	Menge	+	+ / ++	+++	+	++
	Zisternen	+ / ++	++	+++	+	+++
	Fenestrierung	++	+ / ++	+	+	+
	Aktivität	+ / ++	+	+++	+	+++
Lysosomen	Menge	++	++/+++	+ / ++	++	+++
	Primäre Lysosomen	+	+ / ++	++	+	++
	Sekundäre Lysosom.	++	++	+	++	++
	Tertiäre Lysosomen	+	+	+ / -	++	++
	Myelin	+	+ / ++	+	++	++
	Autophagosomen	+ / -	-	+ / ++	-	+
	Vakuolen	+	++	++/+++	+	+ / ++
Lipid	Menge	+	+	+	-	-
	Lage im Glykogen	+	+	+	-	-
Glykogen	Menge	+ / ++	++	+++	++++	++
	Part. Entspeicherung	-	-	+	++	-
Interzellularen	geschlossen	++	+ / ++	+ / ++	+++	+
	erweitert	+	++/+++	+++ / +	+	+++
Fremdzellen	Makrophagen	++/+++	++	++/+++	++	+

- Merkmal fehlt

+ selten

++ Merkmal deutlich ausgeprägt

+++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt

++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden bzw. ausgeprägt

■ nicht auswertbar; zu großer Unterschied
zwischen den einzelnen Individuen

■ leichter Unterschied zu den Kontrollen

■ deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

Geschlechtern gemeinsam und wurde im folgenden als intrazelluläre Gliederung bezeichnet (Braunbeck 1989). Bei den Weibchen war sie durch die großen unregelmäßigen Zellkerne und die geringen Glykogenspeicher weniger stark ausgeprägt.

Die elektronenmikroskopische Auswertung zeigte das Leberparenchym der männlichen Kontrollfische als kompakte und relativ homogene Struktur mit wenig Interzellularräumen, aber einem verhältnismäßig hohen Anteil an Makrophagen. Der heterochromatinreiche Zellkern lag peripher (Abb. 15). Die den Zellkern umgebenden Cytoplasmaareale waren gekennzeichnet durch ein für Männchen recht ausgeprägtes rauhes endoplasmatisches Retikulum (rER), in dem regelmäßig vorkommende, sehr homogenen Mitochondrien, sowie vereinzelte Myelinwirbel, Vakuolen und lysosomale Elemente zwischen die Zisternen eingestreut lagen. Das rER war in Lagen von bis zu 5 Zisternen übereinander geschichtet. Die Zisternen selbst wiesen eine leichte Fragmentierung auf und waren geringfügig dilatiert. Der Golgi-Apparat lag in der Regel zwischen Gallencanaliculus und Zellkern, war jedoch insgesamt sehr schwach entwickelt und wies eine geringe Aktivität (Anzahl der abgeschnürten Vesikel) auf. Im elektronenmikroskopischen Bild erschien der Golgi-Apparat als undeutliche, vesikulierte Struktur, was aufgrund der seltenen direkten Anschnitte der Golgi-Zisternen auf seine geringe Größe schließen ließ. Die Hepatocyten der weiblichen Kontrollfische waren von einem gut entwickelten Protein-Lipoproteinsyntheseapparat geprägt. Stapel aus bis zu 13 parallelen Zisternen bildeten eine nahezu geschlossene Manschette um den heterochromatinreichen Zellkern. In der Zellperipherie lagen weitere Stapel aus 5-10 parallelen rER-Zisternen, die teilweise mit der inneren Manschette verbunden waren (Abb. 18). Zwischen die rER-Zisternen waren gleichmäßig runde bis ovale Mitochondrien eingestreut. Golgi-Felder kamen regelmäßig vor, jedoch erschienen sie meist wie bei den Männchen als undeutliche, vesikulierte Struktur, wobei die etwas höhere Anzahl der Vesikel auf eine im Vergleich zu den Männchen leicht erhöhte Aktivität schließen ließ. Die Glykogenspeicher waren deutlich geringer als bei den Männchen ausgeprägt und zeigten teilweise eine recht starke partielle Entspeicherung. Lysosomale Elemente kamen regelmäßig vor, dagegen fanden sich Peroxisomen und Lipid sehr selten.

1 µg/L Nonylphenol

Schon im Lichtmikroskop fielen bei beiden Geschlechtern die gegenüber den Kontrolltieren deutlich vergrößerten Glykogenspeicher auf (Abb. 11 und 12). Dadurch wurde die intrazelluläre Gliederung insgesamt ausgeprägter. Die Parenchymheterogenität nahm bei den Männchen aufgrund der geringeren Anzahl von Fremdzellen etwas ab.

Die auffälligsten Veränderungen fanden sich im Bereich des Protein-Lipoproteinsyntheseapparats und waren bei beiden Geschlechtern gleichermaßen vorhanden (Abb. 16, 19 und 21). Bei den Männchen beschränkte sich diese Veränderung auf die leicht erhöhte Menge der Dictyosomen. Dagegen nahm die Fenestrierung des Golgi-Apparates etwas ab. Die Menge des rER blieb unverändert, jedoch vergrößerte sich die Anzahl der parallelen Zisternen, und die Fragmentierung des rER war verringert (Abb. 16).

10 µg/L Nonylphenol

Die Glykogenfelder waren bei den mit 10 µg/L Nonylphenol behandelten Tieren noch stärker ausgeprägt als bei der geringeren Konzentration (Abb. 13 und 14). Dadurch war auch die intrazelluläre Gliederung auffällig ausgeprägt. Allerdings nahm bei den Männchen auch die Parenchymheterogenität weiterhin zu, verursacht vor allem durch das verstärkte Auftreten von Makrophagen und erweiterten Interzellularräumen (Abb. 17). Wie auch schon bei den gegenüber 1 µg/L Nonylphenol exponierten Tieren fand sich hier bei allen Versuchstieren die stärkste Veränderung zur Kontrolle im Bereich des Protein-Lipoproteinsyntheseapparats (Abb. 16 und 19). Die Menge des rER lag gegenüber den Kontrollen höher. Außerdem zeigte sich eine verstärkte Tendenz zur Stapelbildung. Andererseits war auch eine deutliche Dilatation der rER-Zisternen festzustellen.

Die Menge der Dictyosomen erhöhte sich im Vergleich zur niedrigeren Konzentration nochmals und wies damit eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung auf. Das Gleiche galt für die Anzahl der Zisternen und deren Aktivität (Abb. 20). Es ist zu berücksichtigen, dass die Zisternenmenge bei den Männchen noch stärker als bei den Weibchen zunahm. Die Mitochondrien traten bei den Männchen in geringerer Anzahl auf und zeichneten sich durch größere Heterogenität aus. Die Menge der Peroxisomen war leicht erhöht, ebenso die Menge der lysosomalen Elemente und die Vakuolenbildung.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 9: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **Wasserkontrolle**, ♂. Die Parenchymheterogenität ist gering. Der Grad der intrazellulärer Gliederung ist aufgrund der klaren Abgrenzung zwischen dunklen peripheren Speicherarealen und hellen Cytoplasmaarealen hoch. Pfeile zeigen auf die Zellkerne. 100 x

Abb. 10: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **Wasserkontrolle**, ♀. Die Glykogenfelder sind klein und bei weitem nicht in jeder Zelle zu finden. Si = Sinusoid, 100 x

Abb. 11: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **1 µg/L Nonylphenol**, ♂. Bei 1 µg/L Nonylphenol findet eine deutliche Vergrößerung der Golgi-Felder statt. Das Leberparenchym weist nur eine geringe Heterogenität auf. 290 x

Abb. 12: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **1 µg/L Nonylphenol**, ♀. Wie in Abb. 11 ist eine deutliche Vergrößerung der Glykogenfelder zu beobachten. Pfeile zeigen auf die Zellkerne. Si = Sinusoid, 290 x

Abb. 13: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **10 µg/L Nonylphenol**, ♂. Die Glykogenspeicher sind bei 10 µg/L Nonylphenol sehr deutlich ausgeprägt. Der Nucleolus in den Zellkernen ist gut erkennbar. Si = Sinusoid, 290 x

Abb. 14 Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **10 µg/L Nonylphenol**, ♀. Wie bereits bei Exposition gegenüber 1 µg/L Nonylphenol sind die Glykogenspeicher sehr deutlich ausgeprägt. Pfeile zeigen auf die Zellkerne. 750 x

Ethinylestradiol-Wasserkontrollen

Bereits lichtmikroskopisch zeigten beide Geschlechter eine deutliche intrazelluläre Gliederung (Abb. 23 und 24). Das um den Kern gelegene organellenreiche Cytoplasma war deutlich von den es umgebenden Speicherarealen abgegrenzt. Die Glykogenmenge zeigte einen deutlichen Sexualdimorphismus, da sie bei den männlichen Kontrollfischen wesentlich größer war als bei den Weibchen. Bei den Männchen nahmen die Glykogenfelder bis zu 80 % des Zellquerschnitts ein, bei den Weibchen lediglich 40-50 %. Bei letzteren war dagegen der den Zellkern und die größte Menge des rER enthaltende Cystoplasmabereich stärker entwickelt.

Die Weibchen wiesen ein kompaktes homogenes Leberparenchym auf, in dem Fremdzellen selten auftraten. Die Hepatocyten besaßen eine große Menge rER, das in Stapeln von 10-17 parallelen Zisternen den Zellkern umgab (Abb. 28). Die Stapel erstreckten sich oft bis an die Zellgrenzen. Eine Trennung in kernnahes und peripheres rER gelang nur selten. Das rER zeigte nur wenig Fragmentierung und so gut wie keine Dilatation. Die überwiegend in das rER eingestreuten Mitochondrien wiesen neben runden bis ovalen auch sehr häufig nieren- und birnenartige Formen auf.

Der Golgi-Apparat war zwar etwas stärker entwickelt als bei den männlichen Kontrolltieren (s.u.). Meist waren nur bis zu 3 sehr kurze Zisternen mit geringer Aktivität zu finden (Abb. 28). Lipidspeicher waren nicht vorhanden, lysosomale Elemente eher selten.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 15: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **Wasserkontrolle**, ♂. Das rER ist nur mäßig ausgeprägt und weist relativ häufig leichte Dilatation und Fragmentierung auf. Der Kern ist gleichmäßig geformt und besitzt einen recht großen Nucleolus (Nu). Ein deutlich ausgeprägter Golgi-Apparat wie auf dieser Abbildung ist bei den männlichen Kontrollhepatocyten die Ausnahme. 5.000 ×

Abb. 16: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **1 µg/L Nonylphenol**, ♂. Die rER-Menge ist leicht erhöht, und die Stapelbildung ist deutlich sichtbar. 2.500 ×

Abb. 17: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **10 µg/L 4-Nonylphenol**, ♂. Die Menge des rER ist gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht. Das Glykogen ist teilweise entspeichert, die Interzellularen sind hier deutlich erweitert. Lys = Lysosom, 2.000 ×

Vorherige Seite

Abb. 18: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **Wasserkontrolle**, ♀. Die rER-Zisternen bilden mehr oder weniger deutliche Stapel, die rER-Menge ist bei den Weibchen schon in der Kontrolle relativ groß. Das Glykogen ist partiell entspeichert. 8.000 ×

Abb. 19: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **1 µg/L 4-Nonylphenol**, ♀. Der Golgi-Apparat weist eine hohe Aktivität auf. Er besteht aus langgestreckten Zisternen und schnürt eine Vielzahl dunkler Vesikel ab. Lys = Lysosom. 5.000 ×

Abb. 20: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **10 µg/L 4-Nonylphenol**, ♀. Die Aktivität der Golgi-Apparate ist bei 10 µg/L 4-Nonylphenol noch höher als bei 1 µg/L 4-Nonylphenol (vgl. Abb. 21). Der Golgi-Apparat ist zwar insgesamt etwas kleiner, jedoch ist die Anzahl der abgeschnürten Vesikel deutlich höher. 2.000 ×

Die Männchen besaßen ein sehr inhomogenes Leberparenchym. (Abb. 27). Neben den häufigen dunklen Hepatocyten, die dicht mit Glykogen angefüllt waren, fanden sich im Parenchym neben einem hohen Anteil an Fremdzellen auch eine geringe Menge eines hellen Zelltyps, bei dem die Glykogenreserven teilweise abgebaut waren (lockere Packung des Glykogens). Außerdem zeigten diese Zellen viele auffällige rER-Stapel, die sich stark von denen der dunklen Zellen unterschieden. Dieser Zelltyp machte etwa 10 % aller untersuchten Zellen aus. Bei der Mehrzahl der Zellen („dunkle Zellen“) lag ein nur gering ausgeprägtes rER vor. Es bildete einen Ring aus 2-3 parallelen Zisternen um den Zellkern. Weiteres rER war in der Zellperipherie als sehr kurze Stapel aus bis zu 17 parallelen Zisternen zu finden, jedoch waren hier kurze Stapel aus 6-5 parallelen Zisternen die Regel.

Die rER-Zisternen waren nicht dilatiert und nur geringfügig fragmentiert. Die Mitochondrien befanden sich normalerweise im Randbereich des rER und zeigten mit vielen langgestreckten Formen eine hohe Heterogenität. Der Golgi-Apparat blieb in den meisten Zellen sehr klein und war nur wenig aktiv. Lysosomale Elemente waren dagegen häufig.

Nächste Seite

Abb. 21: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **1 µg/L 4-Nonylphenol**, ♀. Die große Menge rER weist neben einer leichten Dilatation eine ausgeprägte Stapelbildung auf. 8.000 ×

Abb. 22: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **10 µg/L 4-Nonylphenol**, ♀. Besonders auffällig ist der große Bereich, den der Golgi-Apparat einnimmt. 2.000 ×

Vorherige Seite

Abb. 23: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **17 α -Ethinylestradiol-Kontrolle, ♂**. Das Leberparenchym weist eine sehr kompakte Form auf. Die Zellen sind dicht mit Glykogen bepackt, so dass außer dem Zellkern der cytoplasmatische Zellanteil kaum zu erkennen ist. 150 \times

Abb. 24: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **17 α -Ethinylestradiol-Kontrolle, ♀**. Die Kontrollweibchen zeigen eine deutliche intrazelluläre Kompartimentierung, die Glykogenfelder sind kräftig ausgebildet. Die Parenchymheterogenität ist gering. Die Pfeile kennzeichnen die Zellkerne, deren Nucleoli schon im Lichtmikroskop gut sichtbar sind. 290 \times

Abb. 25: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **17 α -Ethinylestradiol, ♂**. Unter 17 α -Ethinylestradiol-Exposition kommt es zu einer drastischen Verringerung der Glykogenspeicher. Gleichzeitig nimmt die Parenchymheterogenität aufgrund der vielen erweiterten Interzellularen stark zu. 290 \times

Abb. 26: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **17 α -Ethinylestradiol, ♀**. Im Lichtmikroskop zeigen die Zellen ein sehr homogenes Parenchym. Die Glykogenfelder sind etwas kleiner als bei den Kontrollen. 290 \times

Ethinylestradiol

Die mit Ethinylestradiol behandelten Männchen zeigten eine signifikante Abnahme der intrazellulären Gliederung. Diese Abnahme wurde vor allem durch einen drastischen Rückgang der Glykogenmenge und durch den ungleichmäßigen Umriss der Glykogenfelder verursacht. Nahmen diese bei den Kontrollmännchen noch bis zu 80 % des Zellquerschnitts ein, so waren es bei den gegenüber EE2-exponierten Tieren maximal 10 %.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 27: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **17 α -Ethinylestradiol-Kontrolle, ♂**. Das Parenchym weist eine recht kompakte Struktur auf. Die Zellen sind dicht mit Glykogen angefüllt und besitzen verhältnismäßig wenig rER. Deutlich sichtbar ist jedoch ein „veränderter heller Zelltyp“ (*), der im gesamten Parenchym etwa 10 % ausmacht. In diesen Zellen ist das Glykogen weniger dicht gepackt, und die rER-Stapel sind mächtiger. 2.000 \times

Abb. 28: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **17 α -Ethinylestradiol, ♀**. Unter 17 α -Ethinylestradiol-Exposition kommt es zu einer drastischen Verringerung der Glykogenspeicher. Gleichzeitig nimmt die Parenchymheterogenität aufgrund der vielen erweiterten Interzellularen stark zu. Deutlich zu erkennen sind auch fragmentierte und dilatierte Bereiche im rER. Die Kerne weisen einen wesentlich geringeren Heterochromatingehalt auf. 2.000 \times

Ein weiterer Faktor, der zum zunehmenden Verlust der intrazellulären Gliederung führte, war die starke Dilatation und Fragmentierung des rER. Die Männchen zeigten aufgrund der zahlreichen Fremdzellen und erweiterten Interzellularen eine sehr hohe Parenchymheterogenität (Abb. 25 und 29).

Vereinzelt traten auch Autophagosomen auf. Das Cytoplasma nahm einen großen Teil des Zellquerschnitts ein und enthielt eine erhebliche Menge an rER. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren war die Stapelbildung hier etwas undeutlicher. Zwar wurden die Stapel nach wie vor aus 5-11 parallelen Zisternen gebildet, doch blieben die Stapel kurz und aufgrund des deutlich erhöhten Fragmentierungsgrades und der starken Dilatation sehr uneinheitlich. Die Menge der Golgi-Apparate nahm stark zu, ebenso ihre Aktivität. Die weiblichen mit Ethinylestradiol belasteten Individuen zeigten weniger drastische Veränderungen. So war die intrazelluläre Gliederung mit der der Kontrollhepatocyten bis auf eine leichte Verringerung der Glykogenspeicher identisch (Abb. 24).

Die Parenchymheterogenität erfuhr aufgrund einer geringfügigen Zunahme der Fremdzellen sowie einer Auflockerung des kompakten Zellverbandes eine leichte Verringerung. Der Kern, der sehr wenig Heterochromatin besaß, war von einem Ring aus etwa 10 parallelen, sehr stark fragmentierten und dilatierten Zisternen des rER umgeben; dabei war die rER-Menge gegenüber der Kontrolle nicht erhöht. Die Menge der sehr homogenen Mitochondrien schien verringert, dagegen fanden sich recht häufig primäre Lysosomen. Die Menge der Dictyosomen war deutlich erhöht. Die Golgi-Apparate bestanden zumeist aus 4-5 sehr langgezogenen Zisternen (Abb. 30), die nur geringfügig fenestriert waren. Durch diese Oberflächenvergrößerung des Golgi-Apparates stieg auch dessen Aktivität.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 29: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **17 α -Ethinylestradiol-Kontrolle**, ♀. Auffällig ist der sehr kleine Golgi-Apparat mit nur geringer Aktivität in einem Teil der Hepatocyten. Das rER ist in diesem Bereich auffällig fragmentiert und dilatiert. 6.300 x

Abb. 30: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) adult, **17 α -Ethinylestradiol-Kontrolle**, ♀. Besonders deutlich fällt der Kontrast zwischen dem riesigen Golgi-Feld auf dieser Aufnahme und dem kleinen Golgi-Apparat bei den Kontrollen ins Auge (Abb. 29). Jedoch ist hier auch eine sehr starke Fragmentierung der rER-Zisternen zu beobachten. Die Tendenz zur Vesikulierung und Abkuglung einzelner Zisternen lässt auf eine Störung des Proteinstoffwechsels schließen. 5.000 x

3.4 Induktion der Vitellogeninsynthese in juvenilen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) nach permanenter Belastung mit Nonylphenol

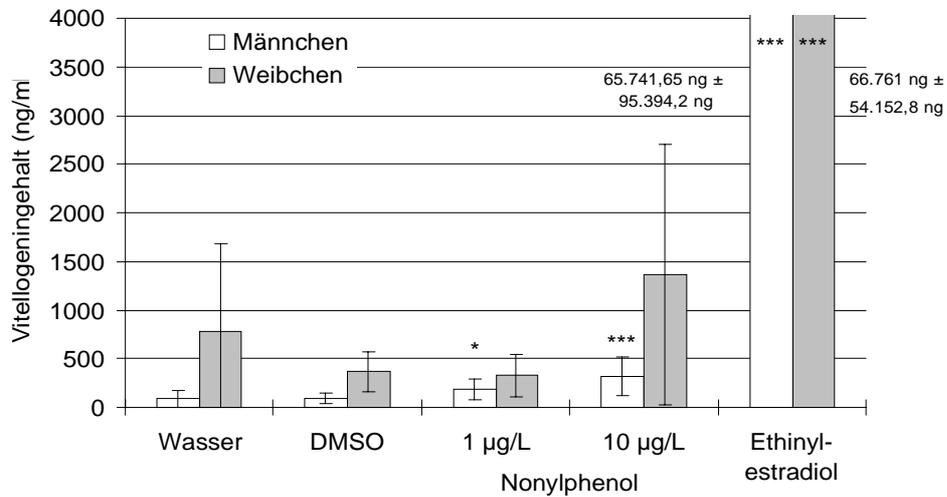


Abb. 31: Vitellogeningehalt im Blutplasma einjähriger Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) nach kontinuierlicher Belastung mit 4-Nonylphenol bzw. 17 α -Ethinylestradiol. Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Tab. 8: Verteilung des Vitellogeningehalts der Individuen auf einen definierten Konzentrationsbereich (Angaben in %). Die am stärksten in einer Versuchsgruppe repräsentierten Konzentrationsbereiche sind dunkelgrau unterlegt.

Vitellogeningehalt (ng/ml)	Konzentrationsbereich									
	0-50	50-100	100-500	500-10 ³	10 ³ -5*10 ³	5*10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -5*10 ⁴	5*10 ⁴ -10 ⁵	>10 ⁵	
Wasser	♂	45	18	27						
	♀		8	50	21	21				
DMSO	♂	31	38	31						
	♀			80	20					
1 µg/L Nonylphenol	♂		40	60						
	♀		19	50	31					
10 µg/L Nonylphenol	♂		9	64	27					
	♀				55	36	9			
17 α -Ethinylestradiol	♂						64	27	9	
	♀						57	33	10	

Auch der Vitellogeningehalt im Plasma der juvenilen Forellenmännchen unterlag einer deutlichen Dosis-Wirkungs-Beziehung. Schon bei einer Belastung mit 1 µg/L Nonylphenol zeigte sich eine signifikante Abweichung von der Kontrolle (Abb. 31). Bei einer Belastung mit 10 µg/L Nonylphenol sowie bei der Positivkontrolle (17α-Ethinylestradiol) bestand ein hoch signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren. Bei den Weibchen waren die Schwankungen zwischen den einzelnen Individuen jedoch so hoch, dass nur bei der Positivkontrolle ein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Dabei lagen die durchschnittlichen Plasmawerte für Vitellogenin bei den Weibchen mit Ausnahme der mit 1 µg/L Nonylphenol und 17α-Ethinylestradiol belasteten stets deutlich höher als bei den Männchen. Die individuellen Schwankungen im Plasma-Vitellogeningehalt sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Die Streuung des Vitellogeningehalts im Plasma war in den meisten Versuchsgruppen gering (über 50 % der Individuen in einem Konzentrationsbereich). Eine Ausnahme bildeten die Männchen der Wasser- und DMSO-Kontrolle (Tab. 8).

3.5 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber einjähriger Regenbogenforellen nach permanenter Belastung mit Nonylphenol

Aufgrund des normalerweise ausgeprägten Sexualdimorphismus in der Leber von Fischen wurde auch bei Juvenilen zwischen Männchen und Weibchen unterschieden. In den Tabellen 9 und 10 sind die Befunde zu den ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber männlicher und weiblicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) aufgelistet und semiquantitativ bewertet.

Nächste Seite

Abb. 32: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **Wasserkontrolle, ♀:** Rauhes endoplasmatisches Retikulum (rER) und Golgi-Apparate sind deutlich ausgeprägt. Die Zelle weist eine geringfügige Fragmentierung der rER-Zisternen auf. 5.000 ×

Abb. 33: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **Wasserkontrolle, ♀:** Der Golgi-Apparat besteht nur aus wenigen Zisternen und weist eine geringe Aktivität auf. 17.500 ×

Abb. 34: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **Wasserkontrolle, ♂:** Die Zellen weisen eine klare intrazelluläre Kompartimentierung in organellenhaltiges Cytoplasma und (meist periphere) Speicherareale auf. Myelinwirbel im Glykogen sind häufig anzutreffen. 8.600 ×

Abb. 35: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **Wasserkontrolle, ♂:** Der Golgi-Apparat besteht aus langgestreckten Zisternen, die nur wenige kleine Vesikel abschnüren. 14.600 ×

3. Forellen Nonylphenol

Tab. 9: Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in der Leber Nonylphenol-exponierter juveniler weiblicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

		Kontrolle	DMSO	Nonylphenol		Ethinyl- estradiol
				1 µg/L	10 µg/L	
Intrazelluläre Gliederung		+++	+++	+++	++	+ / +++
Parenchymheterogenität		++	++	++	++ / +++	++ / +++
Kern	Regelmäßige Form	+++	++	+++	+++	+ / +++
	Zentrale Lage	++	++	++	+	++
	Heterochromatin	+	++	+	+ / +++	+ / -
	Nucleolus	+	++	+	+ / +++	+ / -
Mitochondrien	Menge	++	++	++	+ / +++	++ / +++
	Größe	+	++	+	+ / +++	++
	Heterogenität	++	++	+++	+++	+++
	Intramitoch. Granula	+	+	+	+	+
Peroxisomen	Menge	++	++	++	++ / +++	++
	Größe	+	+	+	+	+
	Heterogenität	+	+	+	+	+
rER	Menge	++	++	+++	+++	++ / +++
	Stapel	+ / +++	++	++	+++	++ / +++
	Paral. Zisternen	+++	+++	+++	+++	+++
	Fragmentierung	+ / +++	+	++	++	++
	Dilatation	-	-	-	-	++ / +++
sER	Menge	+	+	+	+	+
	Stapel	-	-	-	-	-
	Lage im Glykogen	-	-	-	-	-
Golgi	Menge	+	+	+ / +++	++	++
	Zisternen	+	+	+	++	+ / +++
	Fenestrierung	+ / +++	+	++	+	+ / +++
	Aktivität	+ / +++	+ / +++	+	++	++ / +++
Lysosomen	Menge	++	+	++	++	++ / +++
	Primäre Lysosomen	+	+	+	+	+
	Sekundäre und tertiäre L.	++	-	+	+	+++
	Myelin	++	+	++	+	+
	Autophagos	+	+	+	+	+
	Vakuolen	+	+	+	+ / +++	++
Lipid	Menge	+	+	+	+	+ / +++
	Lage im Glykogen	-	+	+	+	+
Glykogen	Menge	+	+	++	+	++
	Part. Entspeicherung	-	-	-	-	-
Interzellularen	geschlossen	+++	+++	+++	+++	++
	erweitert	+	+	+	+	++
Fremdzellen	Makrophagen	+	+	+	++	++ / +++

- Merkmal fehlt

+ selten

++ Merkmal deutlich ausgeprägt

+++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt

++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden bzw. ausgeprägt

■ nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen

■ leichter Unterschied zu den Kontrollen

■ deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

3. Forellen Nonylphenol

Tab. 10: Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in der Leber Nonylphenol-exponierter juveniler männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

		Kontrolle	DMSO	Nonylphenol		Ethinyl- estradiol
				1µg/L	10µg/L	
Intrazelluläre Gliederung		+++	+++	+++	++	++
Parenchymheterogenität		++	+ / ++	+ / ++	+++	+ / ++
Kern	Regelmäßige Form	+++	+++	+ / ++	++	++
	Zentrale Lage	+	+++	+	++	++ / +++
	Heterochromatin	+	++	++	+	++
	Nucleolus	+	+ / ++	++	+	++
Mitochondrien	Menge	++	++	++	+	++
	Größe	+	+	+	+	+
	Heterogenität	+	+	++	+++	++
	Intramitoch. Granula	+	- / +	-	+	-
Peroxisomen	Menge	++	++	+	+	+
	Größe	+	+	+	+	+
	Heterogenität	+	+	++	+	+
rER	Menge	++	++	++ / +++	+++	+++
	Stapel	++	++	++	+++	++
	Paral. Zisternen	+++	+++	++ / +++	+++	+++
	Fragmentierung	+	++	++	+	++
	Dilatation	-	- / +	-	-	++
sER	Menge	+	+	+	+	+
	Stapel	-	-	-	-	-
	Lage im Glykogen	-	-	-	-	-
Golgi	Menge	+	+ / ++	+ / ++	+	++
	Zisternen	+	+	++	+	+
	Fenestrierung	+	+ / ++	+	+++	++
	Aktivität	+ / ++	+ / ++	+++	++	+++
Lysosomen	Menge	+	+ / ++	++	++	++
	Primäre Lysosomen	+	+	+	+	+
	Sekundäre und tertiäre L.	-	+	++	++	++
	Myelin	++	+	++	++	++
	Autophagosomen	+	- / +	+	++	++
Vakuolen		+	+	+ / ++	+	++
		+	+	+	+	++
Lipid	Menge	+	++	+	+	++
	Lage im Glykogen	+	-	+	+	+
Glykogen	Menge	+	+++	+ / ++	+ / ++	++
	Part. Entspeicherung	-	- / ++	+ / ++	+++	+
Interzellulären	geschlossen	+++	+++	+++	++	+++
	erweitert	+	+	+	++	+
Fremdzellen	Makrophagen	++	+ / ++	++	+++	+++

- Merkmal fehlt
 + selten
 ++ Merkmal deutlich ausgeprägt
 +++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt
 ++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden bzw. ausgeprägt

■ nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen
 ■ leichter Unterschied zu den Kontrollen
 ■ deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

Vorherige Seite

Abb. 36: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **DMSO-Kontrolle**, ♀: Auffällig sind die deutlich vergrößerten Nucleoli sowie die höhere Heterochromatinmenge im Kern. Die Weibchen zeigen außerdem eine leicht erhöhte Fragmentierung des rERs. 7.000 ×.

Abb. 37: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **DMSO-Kontrolle**, ♀: Der Golgi-Apparat ähnelt in Struktur und Aktivität denen der Wasserkontrollen und ist von VLDL-Vesikeln (very low density lipoprotein) umgeben. 17.500 ×

Abb. 38: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **DMSO-Kontrolle**, ♂: Es kann gegenüber den männlichen Wasserkontrollen eine leichte Zunahme des Heterochromatins und der Anzahl der Lysosomen beobachtet werden. Auch die Glykogenmenge ist erhöht. 3.700 ×

Abb. 39: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **DMSO-Kontrolle**, ♂: Der Golgi-Apparat der Männchen besteht aus deutlich verkürzten Zisternen 13.600 ×

Wasserkontrollen

In der Wasserkontrolle waren zunächst keine signifikanten Unterschiede zwischen Weibchen und Männchen festzustellen. Die elektronenmikroskopische Auswertung ergab ein homogenes Leberparenchym mit hexagonalen Hepatocyten, die dicht beieinander lagen (Interzellularen geschlossen).

Die klassische intrazelluläre Kompartimentierung der Hepatocyten von Fischen, die sich normalerweise in der deutlichen Trennung zwischen organellenhaltigem Cytoplasma und peripherem Glykogenspeicher äußert, war nur bei den männlichen Individuen ausgeprägt (Abb. 34).

Gegenüberliegende Seite

Abb. 40: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **1 µg/L Nonylphenol**, ♀: Es liegt eine verstärkte Infiltration des Leberparenchyms mit Makrophagen vor. Bei 1 µg/L Nonylphenol ist zum ersten Mal das Glykogen in Feldern organisiert. Auch die rER-Menge ist erhöht. 4.000 ×

Abb. 41: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **1 µg/L Nonylphenol**, ♀: Die Golgi-Zisternen der Weibchen sind wesentlich stärker fenestriert und zeigen gegenüber den Kontrollen eine leichte Verringerung der Golgi-Aktivität. 17.500 ×.

Abb. 42: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **1 µg/L Nonylphenol**, ♀: Die Zellkerne zeigen eine Zunahme der Heterochromatinmenge und deutlich vergrößerte Nucleoli. Die rER-Menge ist gegenüber den Kontrollen leicht erhöht und zeigt stärkere Fragmentierung. 5.500 ×

Abb. 43: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **1 µg/L Nonylphenol**, ♂: Der Golgi-Apparat erscheint als dicht aneinander liegende langgestreckte Zisternen, die nur einen geringen Fragmentierungsgrad aufweisen und eine hohe Aktivität besitzen. 13.700 ×

Bei den Weibchen war insgesamt nur wenig Glykogen vorhanden, das verstreut im Cytoplasma lag (Abb. 32). Der Zellkern besaß bei beiden Geschlechtern eine gleichmäßige Form und lag meist in der Peripherie der Zelle.

In den Kernen war nur wenig Heterochromatin nachzuweisen, welches sich überwiegend in der Kernperipherie befand. Die Hepatocyten waren durch einen stark ausgeprägten (Lipo-) Proteinsyntheseparat geprägt (Abb. 32 und 34).

Das rER lag in Stapeln von 6 bis 10 parallelen Zisternen um den Zellkern. Es zeigte bei beiden Geschlechtern eine leichte Fragmentierung und Fenestrierung, die bei den Weibchen etwas stärker ausgeprägt war. Die zumeist rundlichen bis ovalen Mitochondrien waren zusammen mit den Peroxisomen überwiegend in Kernnähe lokalisiert. Lysosomen waren bei den Weibchen kaum, bei den Männchen in mäßiger Zahl zu beobachten. Myelinwirbel traten verhältnismäßig häufig auf. Der Golgi-Apparat war bei beiden Geschlechtern nur relativ schwach ausgeprägt. Die Golgi-Zisternen waren bei den Männchen langgestreckter und weniger fenestriert (Abb. 35) als bei den Weibchen (Abb. 33). Auch die Aktivität der Golgi-Felder, die sich in der Menge der abgeschnürten Golgi-Vesikel manifestierte, war eher gering. Makrophagen kamen nur bei den Männchen verhältnismäßig häufig vor.

DMSO-Kontrolle (Lösungsmittelkontrolle)

Zwischen DMSO- und Wasserkontrolle existierten bei beiden Geschlechtern kaum Unterschiede (Abb. 36 und 38). Auffällig waren bei beiden Geschlechtern die deutlich vergrößerten Nucleoli sowie die bei den Weibchen erhöhte Heterochromatinmenge im Kern. Die Weibchen zeigten außerdem eine leicht erhöhte Fragmentierung des rER. Die Glykogenspeicher der Männchen waren stärker ausgeprägt als bei den männlichen Fischen in der Wasserkontrolle.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 44: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **10 µg/L Nonylphenol, ♀:** Bei einer Konzentration von 10 µg/L Nonylphenol ist eine massive Zunahme der rER-Menge bei steigendem Fragmentierungsgrad des rER, zu beobachten. Auch die Mitochondrien weisen eine deutlich erhöhte Heterogenität auf. Die Anzahl der Lysosomen ist erhöht. 8.000 ×

Abb. 45: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **10 µg/L Nonylphenol, ♀:** Die Dictyosomen zeichnen sich durch eine höhere Anzahl von Zisternen und Aktivität aus. 17.500 ×

Abb. 46: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **10 µg/L Nonylphenol, ♂:** Das Parenchym weist eine starke Heterogenität auf. Neben der Menge des rER erhöht sich auch dessen Tendenz zur Stapelbildung. Es kann auch eine erhöhte Anzahl von Lysosomen sowie eine erhöhte Glykogenmenge beobachtet werden. 5.000 ×

Abb. 47: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **10 µg/L Nonylphenol, ♂:** Die Golgi-Zisternen sind leicht fragmentiert. Sie zeigen gegenüber den Kontrollen eine deutlich erhöhte Aktivität. 17.500 ×

Während bei den Weibchen keinerlei Unterschiede in der Ausprägung des Golgi-Apparates gegenüber der Wasserkontrolle festzustellen waren (Abb. 37), bestand der Golgi-Apparat der Männchen aus deutlich verkürzten Zisternen (Abb. 39).

1 µg/L Nonylphenol

Die männlichen Regenbogenforellen zeigten nach Belastung mit 1 µg/L Nonylphenol eine Zunahme der Heterochromatinmenge und deutlich vergrößerte Nucleoli (Abb. 41). Die Heterogenität der Mitochondrien war bei beiden Geschlechtern auffällig erhöht, und auch im Proteinsyntheseapparat waren leichte Veränderungen nachzuweisen. So war z.B. die Menge des rER leicht erhöht, wobei die Organisation insgesamt etwas heterogener war. Die Zisternen des rER zeigten eine verstärkte Fragmentierung. Die Dictyosomen waren leicht proliferiert. Bei den männlichen Fischen traten sie als dicht aneinander liegende, langgestreckte Zisternen auf, die nur einen geringen Fragmentierungsgrad aufwiesen. Auch die Aktivität der Dictyosomen war erhöht. Im Gegensatz dazu waren die Golgi-Zisternen der Weibchen (Abb. 40) wesentlich stärker fenestriert und zeigten gegenüber den Wasserkontrollen eine leichte Verringerung ihrer Aktivität. Die Menge der sekundären und tertiären Lysosomen war bei den Weibchen etwas reduziert, dagegen nahm die Glykogenmenge etwas zu, während sie sich bei den Männchen eher verringerte.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 48: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **17α-Ethinylestradiol**, ♀: Das rER zeigt eine starke Dilatation und Fragmentierung. Die Anzahl der Lysosomen ist stark erhöht. 4.000 ×

Abb. 49: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **17α-Ethinylestradiol**, ♀: Bei diesem Weibchen sind die Zellkerne besonders auffällig: Sie besitzen kein Heterochromatin, keine Nucleoli sowie einen sehr unregelmäßigen Kernumriss. Die rER-Menge ist gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht. 3.900 ×

Abb. 50: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **17α-Ethinylestradiol**, ♂: Das rER zeigt neben einer Mengenzunahme auch eine starke Dilatation und Fragmentierung der Zisternen. 8.600 ×

Abb. 51: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, **17α-Ethinylestradiol**, ♂: Die Golgi-Zisternen zeigen eine sehr hohe Aktivität und eine leichte Fragmentierung. 17.500 ×

10 µg/L 4-Nonylphenol

In der höchsten Nonylphenol-Konzentration war bei beiden Geschlechtern eine Zunahme der Parenchymheterogenität zu beobachten. Sie wurde vor allem durch eine verstärkte Infiltration des Leberparenchyms mit Makrophagen verursacht. Es kam auch zu einer Zunahme der Heterochromatinmenge und zu einer erhöhten Heterogenität der Mitochondrien (Abb. 44 und 46). Bei beiden Geschlechtern war eine Proliferation des rER zu beobachten, die jedoch bei den Weibchen etwas stärker ausgeprägt war als bei den Männchen. Neben der Menge des rER erhöhte sich auch die Tendenz des rER zur Ausbildung von Stapeln. Die rER-Stapel bestanden bei den Weibchen aus bis zu 23 parallelen, an den Enden häufig fragmentierten Zisternen.

Bei den Männchen war diese Zunahme nicht so stark, aber in manchen Bereichen des Leberparenchyms dennoch auffällig. Die Menge der Dictyosomen war bei den Weibchen gegenüber den Wasserkontrollen erhöht. Die Dictyosomen der weiblichen Tiere zeichneten sich außerdem durch eine höhere Anzahl von Zisternen und eine höhere Aktivität aus (Abb. 45), die auch bei den Männchen zu beobachten war (Abb. 47). Bei den Männchen konnte zudem eine erhöhte Anzahl von Lysosomen sowie eine erhöhte Glykogenmenge beobachtet werden (Abb. 46)

17α-Ethinylestradiol („Positivkontrolle“)

Nach Belastung mit 17α-Ethinylestradiol kam es zu einem deutlichen Anstieg der Parenchymheterogenität, welche vor allem durch eine massive Immigration von Makrophagen und durch die teilweise deutlich erweiterten Interzellularen verursacht wurde. Der Umriss der Kerne in den Hepatocyten eines der beiden Weibchen war auffällig unregelmäßig; in den Kernen waren weder Heterochromatin noch Nucleoli zu finden (Abb. 49). Dagegen verfügten die Hepatocyten der männlichen Regenbogenforellen über deutlich ausgeprägte Nucleoli und eine gegenüber den Kontrollen leicht erhöhte Menge an Heterochromatin (Abb. 50).

Auch bei der Positivkontrolle waren die deutlichsten Veränderungen im Bereich des Proteinsynthesapparats zu finden. Neben einer Proliferation des rER wiesen die Hepatocyten beider Geschlechter eine erhöhte Tendenz zur Stapelbildung, eine verstärkte Fragmentierung und vor allem eine beträchtliche Dilatation der rER-Zisternen auf (Abb. 48, 50). Die Zahl der Dictyosomen war ebenfalls bei beiden Geschlechtern vermehrt. Darüber hinaus zeigten die Golgi-Zisternen eine sehr hohe Aktivität, die bei den Weibchen stärker als bei den Männchen ausgeprägt war (Abb. 49, 51). Bei den männlichen Tieren konnte auch eine Zunahme der Autophagosomen beobachtet werden.

3.6 Diskussion

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass adulte und juvenile Regenbogenforellen auf eine Belastung mit 4-Nonylphenol und 17α-Ethinylestradiol sowohl mit einem Anstieg des Vitellogeningehalts im Blutplasma als auch mit ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber reagieren.

In vielen *In vivo*-Studien konnte bei Fischen ein nonylphenolinduzierter Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts nachgewiesen werden (*Leucociscus idus*: Allner et al. 1999, *Salmo salar*: Arukwe

et al. 1997, Yadeti et al. 1999, *Zonacres Viviparus*: Christiansen et al. 1998, *Xiphorus maculatus*: Kinneberg et al. 2000, Regenbogenforelle: Jobling et al. 1996, Jobling & Sumpter 1993, Purdom et al. 1994). Die vorliegende Untersuchung bietet jedoch die Möglichkeit, zwei unterschiedliche Lebensstadien einer Fischart in ihren Reaktionen auf eine Belastung mit Nonylphenol zu vergleichen. Allerdings lassen die unterschiedlichen Expositionsszenarien keinen direkten Vergleich zu. Man kann davon ausgehen, daß eine intermittierende Belastung der adulten Regenbogenforellen während der Laichreife aufgrund der vorhandenen Regenerationszeiten insgesamt weniger deutliche Effekte zeigt als eine kontinuierliche Belastung ab der Befruchtung über 12 Monate im Durchfluss, wie sie bei den juvenilen Forellen erfolgte. Dennoch sind die durch eine Belastung mit Nonylphenol induzierten Effekte in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich.

In beiden Versuchen konnte bei den Männchen ab Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol ein signifikanter Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts beobachtet werden. Damit liegt die Nachweisgrenze in der vorliegenden Arbeit um eine Zehnerpotenz niedriger als bei der Untersuchung von Jobling et al. (1996), welche erst ab einer Konzentration von $10 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol einen Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts nachweisen konnten. Aufgrund der unterschiedlichen Vitellogeninkonzentrationen im Plasma der Kontrolltiere beider Versuchsansätze (adult und juvenil) erscheint auch eine Gegenüberstellung der Absolutwerte nicht sinnvoll, sondern vielmehr der Vergleich der Induktionsfaktoren (Vitellogeningehalt belastet/Kontrolle). Die adulten männlichen Forellen reagierten trotz der intermittierenden Belastung um den Faktor 3-10 stärker als die juvenilen Forellenmännchen.

Der Induktionsfaktor der adulten männlichen Regenbogenforellen betrug durchschnittlich 10, während er bei den juvenilen Männchen zwischen 1 und 4 lag. Bei der Nonylphenol-Exposition der juvenilen Regenbogenforellen konnte jedoch vor allem gezeigt werden, dass einzelne Individuen bisweilen sehr unterschiedlich auf die Belastung reagieren. Obwohl bei den juvenilen weiblichen Fischen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Nonylphenolkonzentrationen bestanden, war ein dosisabhängiger Anstieg des Vitellogeningehalts im Plasma tendenziell zu erkennen. Allerdings bleiben – in Analogie zum Experiment mit den adulten, laichbereiten Regenbogenforellen – die Induktionsfaktoren von Nonylphenol für Vitellogenin weit hinter den Induktionsfaktoren von 17α -Ethinylestradiol zurück.

Die Ergebnisse des kompetitiven ELISA waren sehr gut mit den Befunden aus den ultrastrukturellen Untersuchungen in Einklang zu bringen. Auffälligstes Merkmal unter Belastung mit Nonylphenol stellte die Proliferation und Stimulation der (lipo-)protein-synthetisierenden Elemente, also des rER (Synthese) und des Golgi-Apparats (Modifikation, Export) dar. Diese Zunahme wird generell als Symptom für einen Anstieg der Biosyntheserate in der Leber angesehen (Buckley 1984, Segner & Braunbeck 1988), steht hier jedoch in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Anstieg des Vitellogeninlevels im Plasma, da genau diese Organellensysteme das Vitellogenin in der Leber synthetisieren. Peute et al. (1985) konnten bei Zebraäbrlingen (*Danio rerio*) nach 14tägiger Exposition gegenüber $1 \mu\text{g/L}$ 17β -Estradiol ebenfalls eine Proliferation des rER und Golgi-Apparates beobachten. Dabei war in der vorliegenden Studie die Ausprägung dieser Merkmale zwischen juvenilen und adulten Forellen durchaus unterschiedlich: Während bei den juvenilen Regenbogenforellen vor allem eine verstärkte Fragmentierung der rER-Zisternen als Reaktion auf eine Belastung mit Nonylphenol zu beobachten war, zeigten die adulten Regenbogenforellen im wesentlichen eine gesteigerte Dilatation der rER-

Zisternen. Eine leichte Fragmentierung und Dilatation des rER wird einerseits als eine frühe, unspezifische Anpassung des sehr sensibel auf suboptimale Bedingungen reagierenden rER angesehen (Braunbeck et al, 1990a, b, Braunbeck & Völkl 1993, Réz 1986), kann andererseits aber auch als Maßnahme zur Vergrößerung der aktiven Membranoberfläche zur Proteinbiosynthese verstanden werden (Braunbeck 1998). Im Zusammenhang mit einer bei den adulten Männchen beobachteten Proliferation des sER werden diese Veränderungen jedoch auch als Symptom einer Aktivierung von Bio-transformationsprozessen angesehen (Braunbeck & Völkl 1993; sER als Marker für Detoxifikationsprozesse: Braunbeck et al. 1989, 1990, Hacking et al 1978, Hawkes 1980, Hinton et al. 1978, Klauning et al. 1979, Rojik et al. 1983). Auch die Zunahme der Lysosomen (intrazelluläre „Verdauung“, Abbau defekter Zellbestandteile) stellt einen adaptiven Mechanismus zur Kompensation eines erhöhten Umsatzes zellulärer Komponenten unter schadstoffinduziertem Stress dar und belegt eine generelle Stimulation des Zellstoffwechsels unter Schadstoffeinfluss (Braunbeck et al. 1989b, Rez 1986, Salas 1980, Segner & Braunbeck 1990). Die Zunahme der Mitochondrienheterogenität kann als unspezifischer physiologischer Anpassungsprozess der Zelle an einen infolge eines erhöhten Zellstoffwechsels gestiegenen Sauerstoffbedarf gewertet werden (Braunbeck & Völkl 1993, Segner & Braunbeck 1988, Ghadialli 1988). Neben diesen Veränderungen der Hepatocyten konnte eine Infiltration des Leberparenchyms mit Makrophagen und eine Zunahme der Parenchymheterogenität beobachtet werden. Diese Veränderungen werden als unspezifische Reaktion auf eine Schadstoffbelastung angesehen (Braunbeck & Völkl 1993, Burkhard-Holm et al. 1990, Gerundo et al. 1991, Klauning et al. 1979).

Insgesamt können die genannten Veränderungen in den Hepatocyten zwar als pathologische Reaktion auf die Belastung mit Nonylphenol interpretiert werden, eine Bewertung im Sinne degenerativer Veränderungen ist jedoch nicht möglich. Vielmehr sind alle beobachteten Veränderungen als adaptive Reaktionen im Zuge einer Kompensationsreaktion auf eine Exposition gegenüber Nonylphenol zu verstehen (Braunbeck 1998, Braunbeck & Völkl 1993, Cough 1975, Sinderman 1980).

Wesentlich schwerwiegender waren die ultrastrukturellen Veränderungen bei den gegenüber 17α -Ethinylestradiol exponierten Tieren. Hier reagierten die Forellen beider Gruppen mit einer bisweilen sehr starken Dilatation der rER-Zisternen. Diese verstärkte Dilatation der rER-Zisternen wird von Braunbeck (1998) als degenerativer Effekt gewertet, der auf eine Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese hinweist, bei der aufgrund gestörter Synthesvorgänge Zwischenprodukte in den Zisternen akkumulieren oder aber Endprodukte aufgrund einer unzureichenden Funktion der Dictyosomen nicht (schnell genug) aus den Zisternen abtransportiert werden können (Braunbeck et al. 1990). Das Fehlen von Heterochromatin bei den juvenilen Regenbogenforellenweibchen deutet auf eine sehr hohe Zellstoffwechselaktivität hin (Ghadialli 1988). Die unregelmäßige Kernform, welche bei beiden Versuchsgruppen auftritt, dürfte ebenfalls eine Anpassung an die erhöhte Notwendigkeit des Austauschs zwischen Karyo- und Cytoplasma infolge einer Stimulation der Proteinbiosynthese darstellen, da auf diese Weise die Fläche, über die der Austausch erfolgen kann, vergrößert wird (Braunbeck & Völkl 1993, Zahn & Braunbeck 1995).

Die starke Reaktion auf die Belastung mit 17α -Ethinylestradiol kann weniger auf dessen endokrines Potential, als auf dessen toxische Wirkung zurückgeführt werden. Dabei ist die Reaktion der juveni-

len Regenbogenforellen auf Ethinylestradiol wesentlich stärker als die der adulten Regenbogenforellen.

Die Beobachtung, dass bei den juvenilen Regenbogenforellen die cytopathologischen Veränderungen bei manchen Individuen weniger stark ausgeprägt waren als bei anderen, könnte die stark schwankenden Vitellogeningehalte im Blutplasma gerade bei der Positivkontrolle erklären. Solche Schwankungen um das 10-100fache des Vitellogeningehalts zwischen den Individuen gleichen Geschlechts und Alters konnte bei juvenilen Fischen bereits in anderen Untersuchungen nachgewiesen werden (Carlson & Williams 1999, Tyler 1991). Offensichtlich gibt es bei Fischen auch in der Reaktion auf endokrin wirksame Schadstoffe sogenannte „Non-Responders“. Solch eine hohe Variabilität macht es jedoch besonders bei kleinen Stichproben schwer, Unterschiede nachzuweisen (Donohoe et al. 1996). Die hohe Variabilität des Vitellogeninlevels bei juvenilen Fischen kann auf genetische Unterschiede, individuell unterschiedliche Differenzierungs- und Reifegrade, einen unterschiedlichen Stand der Geschlechtsreife (Patino & Schreck 1986, Bohemen et al. 1982) oder auf unterschiedliche Konzentrationen an Steroidhormonen zurückgeführt werden (Carlson & Williams 1999). Gerade die Embryonalphase, in der die sexuelle Differenzierung beginnt und die Juvenilphase, in der die endogenen Hormonspiegel noch verhältnismäßig niedrig sind, stellen kritische Lebensabschnitte für den Einfluss östrogen wirksamer Substanzen (Schäfer et al. 1997, von Westernhagen 1988, Bern 1982) dar.

4. Untersuchung verschiedener Kläranlagenabläufe auf endokrine Wirkung

Zusammenfassung: Ziel dieser Studie war die Untersuchung einer Korrelation zwischen einer Belastung mit Nonylphenol bzw. 17 α -Ethinylestradiol in der komplexen Matrix eines Kläranlagenausflusses und einer Belastung mit Nonylphenol bzw. 17 α -Ethinylestradiol als Monosubstanzen. Dazu wurde in einem ersten Versuch der Plasma-Vitellogenengehalt von männlichen Regenbogenforellen vor und nach Exposition gegenüber dem Ablauf der Kläranlage Starnberger See bestimmt. In einem zweiten Versuch wurden juvenile Karpfen mit Wasser aus dem Ablauf der Kläranlage München Nord (Großlappen) und einem mit Arkopal N-150[®] aufgestockten Abwasser belastet und einer Laborgruppe, die gegenüber Nonylphenol als Monosubstanz exponiert wurde, gegenübergestellt. Als Positivkontrolle dienten in beiden Versuchsteilen mit 17 α -Ethinylestradiol injizierte Regenbogenforellen.

Alle gegenüber dem Auslauf der Kläranlage Starnberger See exponierten Regenbogenforellen reagierten mit einem Anstieg des Vitellogenengehalts um den Faktor 3. Ein Vergleich mit der Positivkontrolle zeigte, dass die Versuchstiere auf eine Belastung mit Klärwasser bezüglich des Plasma-Vitellogenengehalts deutlich schwächer reagierten als auf wiederholte Injektionen mit 17 α -Ethinylestradiol.

Ein signifikanter Anstieg der Plasma-Vitellogeninkonzentration konnte auch bei den juvenilen Karpfen im Laborversuch ab 10 μ g/L Nonylphenol beobachtet werden, während in den Versuchsgruppen aus der Kläranlage keine signifikanten Unterschiede zur Wasserkontrolle zu beobachten waren. Die ultrastrukturelle Analyse der Leber zeigte dagegen bereits ab Konzentrationen ≥ 1 μ g/L Nonylphenol dosisabhängige Veränderungen. Die deutlichsten Effekte waren eine dosisabhängige Zunahme der Menge der rER-Zisternen sowie der Dictyosomen, verbunden mit einer verstärkten Stapelbildung des rER, sowie eine erhöhte Fragmentierung des rER, begleitet von einer deutlichen Dilatation der rER-Zisternen bei einer Belastung mit 15 μ g/L Nonylphenol. Die mit 17 α -Ethinylestradiol belasteten Karpfen zeigten die gleichen Effekte, jedoch sehr viel deutlicher. Diese Veränderungen stehen allgemein im Zusammenhang mit einer verstärkten (Lipo-)Proteinbiosynthese und können als Hinweis auf eine Induktion der Vitellogeninsynthese interpretiert werden. Analog zur Messung des Plasma-Vitellogenengehalts konnten auch bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der in der Kläranlage Großlappen exponierten Karpfen keine deutliche Korrelation zu den im Labor exponierten Versuchstieren gezogen werden.

Die Befunde dieser Untersuchung deuten darauf hin, dass in der komplexen Matrix eines Kläranlagenausflusses auch Substanzen vorkommen können, die die endokrine Wirksamkeit von Nonylphenol maskieren bzw. eine zu Nonylphenol antagonistische Wirkung entfalten.

4.1 Einleitung

Eine Vielzahl anthropogener Substanzen gelangt über die Ausflüsse von Kläranlagen in die Umwelt. Dabei kann die Zusammensetzung der Kläranlagenabwässer je nach Einzugsgebiet stark variieren.

Eine der wichtigsten endokrin wirksamen Substanzgruppen stellen in diesem Zusammenhang die Alkylphenol-ethoxylate dar. Nonylphenol als ein Vertreter der Alkylphenole konnte in britischen Kläranlagen in der Vergangenheit mit Konzentrationen von bis zu mehreren 100 µg/L gemessen werden (Jobling et al. 1998, Warhurst et al. 1995, Naylor 1995, Ahel et al. 1994). Dabei ist die Höhe der Alkylphenolkonzentration im wesentlichen von der Art der Abwässer abhängig. Die höchsten Konzentrationen konnten hier für England in Abwässern von Papier- und Textilfabriken beobachtet werden (Sumpter 1995, Warhurst et al. 1995). Aber auch in kommunalen Kläranlagen der Bundesrepublik Deutschland wurden Konzentrationen zwischen 1-15 µg/L allein für Nonylphenol gemessen (Schrenk-Bergt & Steinberg 1998). Bei Messungen in bayerischen Oberflächengewässern (Zellner & Kalbfus 1997) konnten innerhalb von Kläranlageneinleitungen bis zu 400 µg/L Nonylphenol nachgewiesen werden, auf unbelasteten Gewässerstrecken zwischen 10-20 µg/L Nonylphenol.

Außerdem gelangen auch natürliche (z.B. 17β-Estradiol, Estron und Estriol) und synthetische Steroide (z. B. 17α-Ethinylestradiol) als Stoffwechselprodukte von Kontrazeptiva und aus der Nutztierhaltung in nicht unerheblichen Mengen in die Kläranlagen (Aherne & Briggs 1989, Knight 1980, Scholz & Gutzeit 2000). In der Vergangenheit konnten aufgrund der Verwendung von 17α-Ethinylestradiol (EE2) in Verhütungsmitteln Konzentrationen von 1-7 ng/L EE2 in Kläranlagenabläufen gefunden werden (Desbrow et al. 1998, Larsson et al. 1999), obwohl das von Frauen ausgeschiedene EE2 in der Regel glucuroniert und somit nicht östrogen wirksam ist (Matthiessen & Sumpter 1996).

Der Umstand, dass es sich bei Kläranlagenabläufen um Schadstoffgemische in einer komplexen Matrix handelt, macht die Abschätzung eines endokrinen Gefährdungspotentials nur anhand der gemessenen Schadstoffe sehr schwierig, da eine Mischung unterschiedlicher schwacher Xenooöstrogene eine stärkere endokrine Wirkung haben kann als jede Substanz isoliert (Arnold et al. 1997, Kortenkamp & Altenburger 1999, Soto et al. 1984, Sumpter & Jobling 1995, Vonier et al 1996). Andererseits kann die östrogene Wirkung durch Substanzen mit antiöstrogener oder androgener Wirkung abgeschwächt oder sogar aufgehoben werden (Sumpter 1995, Matthiessen & Sumpter 1996).

Ziel dieser Untersuchung war eine Korrelation zwischen einer Belastung mit Nonylphenol bzw. 17α-Ethinylestradiol in der komplexen Matrix eines Kläranlagenausflusses und einer Belastung mit Nonylphenol und 17α-Ethinylestradiol als Monosubstanz. Dazu wurden in einem ersten Versuch adulte männliche Regenbogenforellen gegenüber dem deutlich mit Steroiden und Nonylphenol belasteten Auslauf der Kläranlage *Starnberger See* exponiert. Als Kontrolle wurde männlichen Regenbogenforellen 17α-Ethinylestradiol intramuskulär injiziert. Der Plasma-Vitellogeningehalt der Tiere wurde vor und nach Belastung bestimmt. Die Besonderheit dieses Versuchs bestand darin, dass die Versuchstiere mit einem Transponderchip markiert und so individuell erkennbar waren.

In einem zweiten Versuch wurden juvenile Karpfen gegenüber dem Ablauf der Kläranlage *München Nord (Großlappen)* (Nonylphenolkonzentration: ca. 1 µg/L Nonylphenol) sowie dem gleichen Kläranlagenablauf exponiert, der mit dem nonylphenolhaltigen technisch eingesetzten Produkt Arkopal N-150[®] aufgestockt wurde (Nonylphenolkonzentration: 10 µg/L Nonylphenol). Beide Versuchsgruppen wurden juvenilen Karpfen, gegenübergestellt, die im Labor mit 1, 10 und 15 µg/L Nonylphenol belastet wurden.

4.2 Messung des Vitellogeningehalts im Blutplasma adulter männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) nach Belastung mit dem Ablauf der Kläranlage Starnberger See

Aus den Daten des Landesamts für Wasserwirtschaft geht in Bezug auf die Belastung des Ablaufs der Kläranlage *Starnberger See* hervor, dass neben Nonylphenol auch natürliche (17 β -Estradiol, Estron und Estriol) und synthetische Steroide (17 α -Ethinylestradiol) im Wasser enthalten sind (Tab. 11).

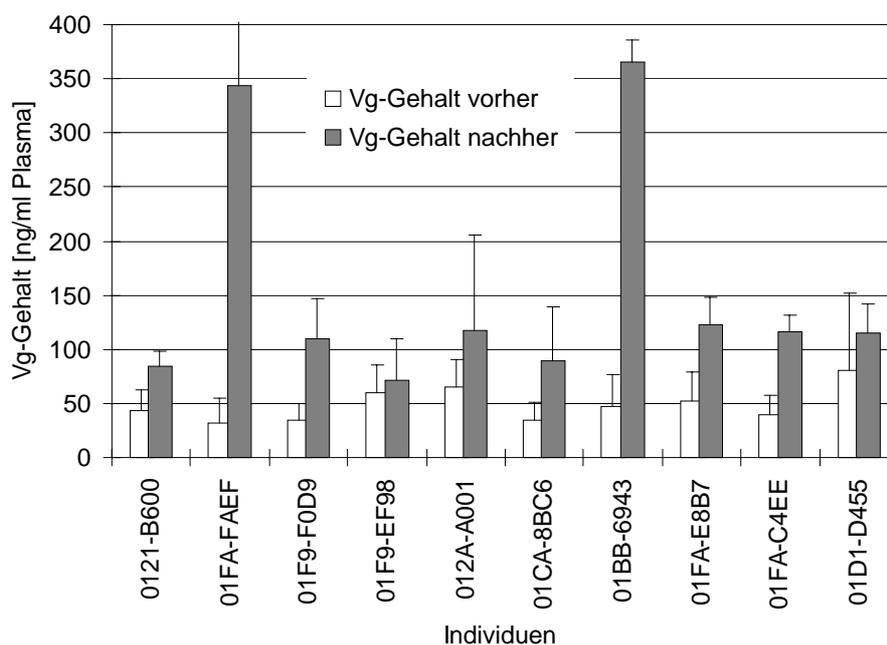


Abb. 52: Vitellogeningehalt im Blutplasma männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) nach Exposition gegenüber dem Ablauf der Kläranlage *Starnberger See*. Die Ordinate zeigt die Transpondercodes der Individuen. Werte als Mittelwert \pm Intraassayvarianz

Tab. 11: Analysewerte der Kläranlage *Starnberger See* für Nonylphenol sowie natürliche (17 β -Estradiol, Estron und Estriol) und synthetische Steroide (17 α -Ethinylestradiol) in ng/L.

Datum	Nonylphenol	17 α - Ethinylestradiol	17 β - Estradiol	Estron	Estriol
30.3.1998	63	1,3	1,6	1,2	13
29.4.1998	28	1	0,5	0,6	6
4.5.1998	34	1,4	0,9	0,7	4

Sowohl auf die Exposition gegenüber dem Auslauf der Kläranlage Starnberger See als auch auf mehrmalige Injektionen von 17α -Ethinylestradiol reagierten alle Individuen mit einer Vitellogenininduktion (Abb 52 und 53).

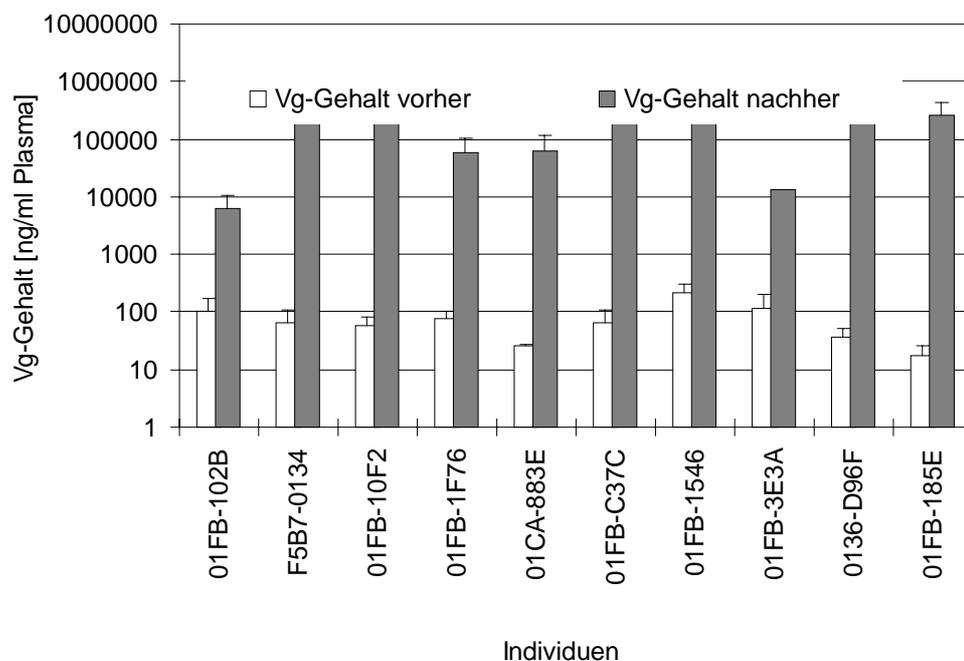


Abb. 53: Vitellogeningehalt im Blutplasma männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) vor und nach wiederholter Injektion von 1 mg/kg Körpergewicht 17α -Ethinylestradiol. Die Ordinate zeigt die Transpondercodes der Individuen. Werte als Mittelwert \pm Intraassayvarianz.

Einen deutlich geringeren Effekt bewirkte die Belastung mit dem Ablauf der Ringkanalisation *Starnberger See* (Abb. 52): Auch hier reagierten alle Regenbogenforellen auf die Schadstoffe im Wasser, der durchschnittliche Vitellogeningehalt betrug jedoch nur 160 ± 112 ng/ml (im Gegensatz zu 50 ± 16 ng/ml vor der Exposition). Der Faktor für die Vitellogenin-Induktion betrug daher im Schnitt nur 3; allerdings waren auch in diesem Experiment die Schwankungen zwischen den Induktionsfaktoren der einzelnen Individuen – sie lagen zwischen 1,2 und 17 – wesentlich geringer als nach Injektion mit 17α -Ethinylestradiol.

Die wiederholt mit 17α -Ethinylestradiol gespritzten Fische wiesen einen durchschnittlichen Vitellogeningehalt von 190.000 ng/ml Plasma auf und zeigten damit im Vergleich zu den Proben vor der Exposition einen Anstieg des Vitellogeningehalts um etwa den Faktor 2000. Dabei schwankten die individuellen Induktionsfaktoren (= Quotient aus Vitellogeningehalt vor und nach Injektion) zwischen 60 und 6000 (Abb. 53).

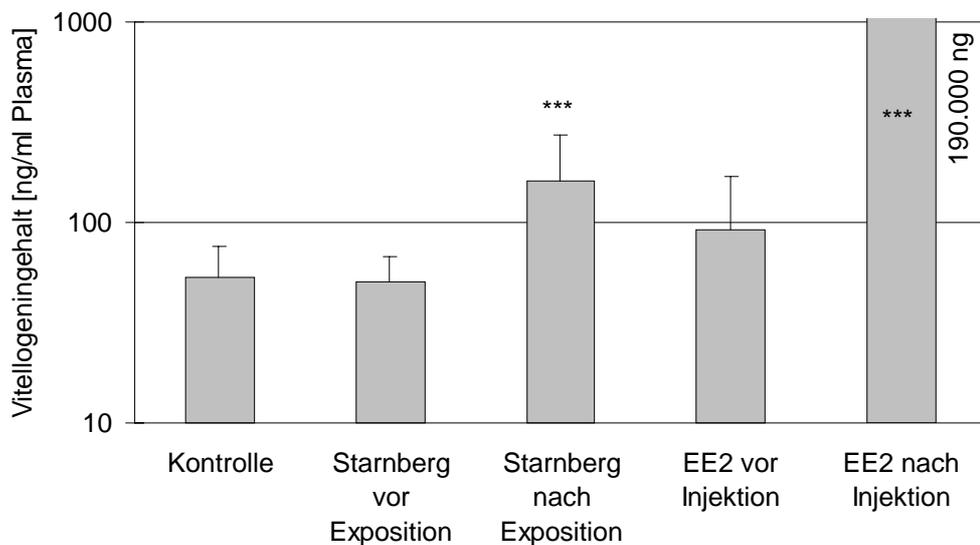


Abb. 54: Vitellogeningehalt im Plasma männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) vor und nach der Exposition gegenüber dem Ablauf der Kläranlage *Starnberger See* bzw. Injektion von 17α -Ethinylestradiol. Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikanz der Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen nach Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Eine Darstellung des durchschnittlichen Vitellogeningehalts aller Versuchsansätze (Abb. 54) zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Kontrollgruppen (Wasserkontrolle, *Starnberger See* vor Exposition, 17α -Ethinylestradiol vor Exposition). Bei den Regenbogenforellen, die dem Ablauf der Kläranlage *Starnberger See* exponiert worden waren, war ein hoch signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg des Vitellogeningehalts im Blutplasma zu verzeichnen. Ebenfalls signifikant aber sehr viel größer war dagegen der Anstieg bei den mit 17α -Ethinylestradiol gespritzten Fische.

4.3 Effekte von Nonylphenol und nonylphenolhaltigen Abwässern auf juvenile Karpfen (*Cyprinus carpio*)

4.3.1 Plasma-Vitellogeningehalt juveniler Karpfen nach Exposition gegenüber Nonylphenol bzw. nonylphenolhaltigen Abwässern

Die Ergebnisse zeigten für diesen Versuchsteil eine klare Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit. Die stärkste Vitellogenininduktion war mit einem Induktionsfaktor von 12 bei den viermal mit $500 \mu\text{g}$ EE2/kg Körpergewicht behandelten Karpfen zu beobachten (Tab. 12). Während bei den mit $1 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol belasteten Karpfen noch kein Unterschied zur Wasserkontrolle erkennbar war, konnte bei $10 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol bereits ein leichter Anstieg der Vitellogenin-Induktion beobachtet werden (Abb. 55). Bei

einer Belastung mit 15 µg/L Nonylphenol stieg der Induktionsfaktor auf den vierfachen Wert der Wasserkontrolle an.

Tab. 12: Übersicht über Induktionsfaktoren und Individuenzahl für Vitellogenin beim Nonylphenol-Laborversuch bzw. nach Belastung mit dem Kläranlagenablauf *München Nord (Großlappen)*. Werte als Mittelwerte ± Standardabweichung der untersuchten Karpfen.

Konzentration	Induktionsfaktor für Vitellogenin im Blutplasma juveniler Karpfen	n
Wasserkontrolle	1	9
1µg/L Nonylphenol	0,79 ± 0,78	5
10 µg/L Nonylphenol	1,50 ± 0,67	7
15 µg/L Nonylphenol	4,27 ± 2,06	14
17α-Ethinylestradiol	11,79 ± 2,10	8
Wasserkontrolle	1	3
Großlappen (ca. 1 µg/L Nonylphenol)	0,70 ± 0,64	3
Arkopal N-150® (ca. 10 µg/L Nonylphenol)	1,92 ± 3,14	6

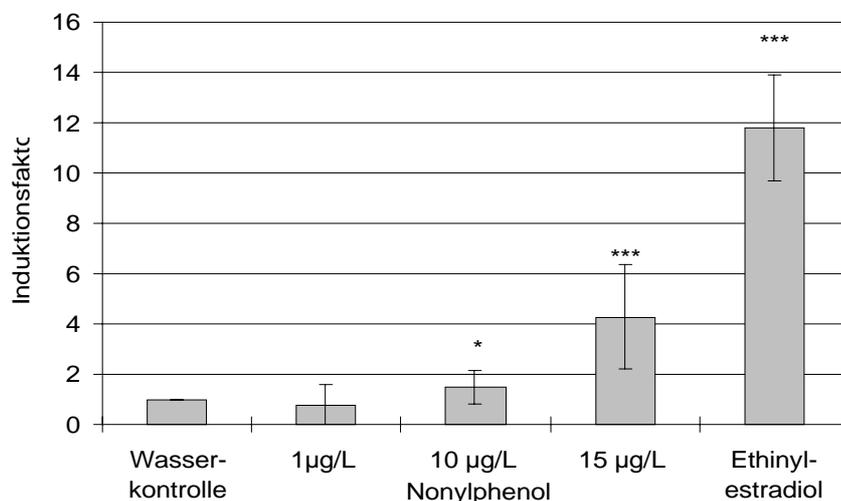


Abb. 55: Induktionsfaktoren des Vitellogeningehalts im Plasma juveniler Karpfen (*Cyprinus carpio*) nach 70 tägiger Belastung mit Nonylphenol bzw. mehrfacher intraperitonealer Injektion von 17α-Ethinylestradiol im Labor. Werte als Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle nach Mann-Whitney U-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Bei den drei Versuchsansätzen in der Kläranlage *Großlappen* war kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen zu beobachten (Abb. 56). Allerdings war die Stichprobenzahl mit 3-6 Tieren in Anbetracht der hohen Abweichungen zwischen den einzelnen Individuen zu gering, um eine sichere Aussage treffen zu können. Im mit Arkopal N-150[®] aufgestockten Versuchsansatz konnte bei einem Individuum ein Induktionsfaktor von 8 gemessen werden, während die anderen untersuchten Tiere kaum auf die Belastung reagierten.

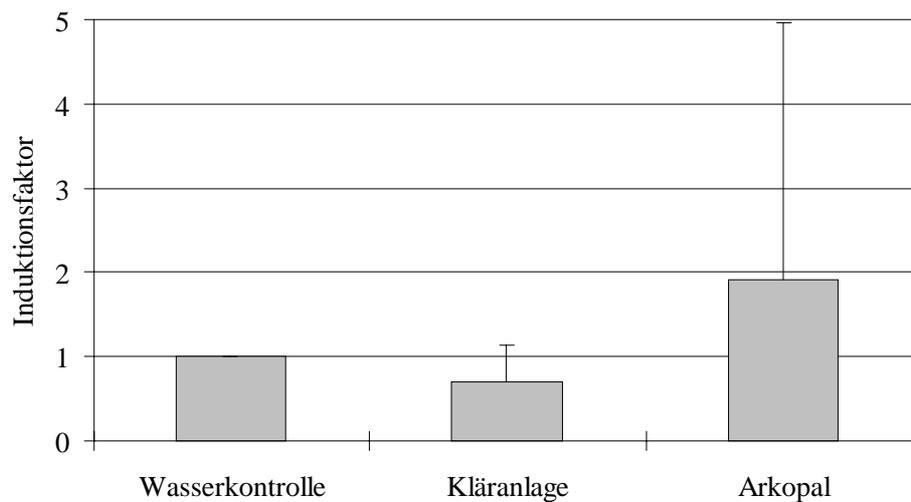


Abb. 56: Induktionsfaktoren des Vitellogeningehalts im Plasma juveniler Karpfen (*Cyprinus carpio*) nach 30 tägiger Exposition gegenüber dem Ablauf der Kläranlage *Großlappen*. Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle nach Mann-Whitney (U-Test): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.2 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber juveniler Karpfen (*Cyprinus carpio*) nach Belastung mit Nonylphenol bzw. nonylphenolhaltigem Abwasser

Die ultrastrukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsansätzen sind in Tabelle 13 zusammengefasst und quantifiziert. Aufgrund des geringen Alters der Tiere war eine Geschlechtsunterscheidung weder morphologisch noch anhand der Ultrastruktur der Hepatocyten möglich. Aus diesem Grund wurde hier nicht nach Geschlecht differenziert.

Tab. 13: Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in der Leber gegenüber Nonylphenol und dem Ablauf der Kläranlage Großlappen exponierter juveniler Karpfen

	Wasser- kontrolle	Ethanol	1 µg/L Nonylphenol	10 µg/L Nonylphenol	15 µg/L Nonylphenol	17α- Ethinyl- estradiol	Kläranlage Auslauf	Kläranlage Arkopal- Versuch
Intrazelluläre Gliederung	+++	++	+++	+++/+	+++	+++	+++	+++
Parenchymheterogenität	++/+++	++/+++	+++	++/+++	+++	+++/+	++/+++	++/+++
Verringerte Zellgröße	-	-	-	-	-	-	+	+
Kern								
Regelmäßige Form	++	++/+++	++	+++	+	+	+++	+++
Zentrale Lage	++	++	++	+++	++	++	++	++
Heterochromatinmenge	++/+++	++/+++	++/+++	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
Nucleolus								
Menge	++	++	++	++	++	++	++	++
Größe	+++	+++	++	++/+++	+++	++/+++	+/++	+/++
Mitochondrien								
Menge	++	++	++	+/++	++/+++	++	++	++
Größe	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+++	+++
Heterogenität	++	++	++	++/+++	++	++	++	++
Intramitochondr. Granula	++	++	++	++	+/++	+	+	+
Peroxisomen								
Menge	+/++	++	+/++	+/++	++	++	++	++
Größe	+	+	+	+	+	+	+	+
rER								
Menge	++	++	++/+++	++/+++	++/+++	++++	++	++/+++
Stapelbildung	++	+/++	++	++/+++	++/+++	+++/+	++	++/+++
parallele Zisternen	++	+	++	++/+++	++/+++	++++	++	+++
Fragmentierung	+/++	++	++	++	+++	+	+/++	++
Dilatation	-	+	+	+	+/++	+	-	+
sER								
Menge	+	+	+	+	+	+/++	+	+
Stapel	-	-	-	-	-/+	-	-	-
Lage im Glykogen	+	+	+	+	+	+/++	+	+

Tab. 13 (Fortsetzung): Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in der Leber gegenüber Nonylphenol und dem Ablauf der Kläranlage Großlappen exponierter juveniler Karpfen

	Wasser- kontrolle	Ethanol	1 µg/L Nonylphenol	10 µg/L Nonylphenol	15 µg/L Nonylphenol	17α- Ethinyl- estradiol	Kläranlage Auslauf	Kläranlage Arkopal- Versuch
Golgi								
Menge	++	+ / +++	++ / +++	+++	+++	+++ / +++++	++	++ / +++
Zisternen	++	++	++ / +++	++ / +++	++ / +++	++	+ / ++	+ / ++
Fenestrierung	+ / +++	++	+ / ++	+	+	+	+ / ++	++
Aktivität	+ / +++	+	++	++	+++ / +++	+++	++	++
Lysosomen								
Menge	+	++	++	+	+ / +++	+	++	+ / ++
Primäre/sekundäre Lysos.	+ / -	++	++	+	+	+	+	+
Tertiäre Lysosomen	-	-	++	-	-	-	+	- / +
Myelin	+	+	+	+	+	+ / ++	+	+
Autophagosomen	+	+	+ / ++	+	++ / -	+	+	+
Vakuolen	+ / +++	+	+ / ++	+ / ++	+ / +++	+ / ++	+	+
Myelin in Gallencanal.	+ / -	-	-	-	++	+ / -	-	-
Lipid								
Menge	+ / +++	+ / +++	++	+ / +++	++	+	+++	++ / +++
Lipidfelder	-	-	-	-	-	-	++ / +++	++ / +++
Myelin um Lipid (Leaflet)	+	+	-	-	+	-	++ / +++	++ / +++
Glykogen								
Menge	+++ / +++	+ / ++	++	+++	+++	+	++	++ / +++
partielle Entspeicherung	+	+++	+	+	+	+	+ / ++	+
Interzellularen								
geschlossen	+	+++ / +++	+++	+ / ++	+ / ++	+++	++	++
erweitert	+++	- / +	++	+++	+++	+	++	+++
Makrophagen								
	+ / +++	+ / ++	++ / +++	++	+ / +++	++ / +++	++	+++

- Merkmal fehlt
 + selten
 ++ Merkmal deutlich ausgeprägt
 +++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt
 ++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden oder ausgeprägt

 nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen
 leichter Unterschied zu den Kontrollen
 deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

Vorherige Seite

Abb. 57: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Wasserkontrolle:** Das homogene Leberparenchym weist zahlreiche erweiterte Interzellularen auf. Die intrazelluläre Gliederung in zentrales (helles) Cytoplasma und periphere (dunkle) Speicherareale ist sehr deutlich ausgeprägt. 290 x

Abb. 58: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **15 µg/L Nonylphenol:** Zahlreiche erweiterte Interzellularen und die ins Parenchym eingewanderten Fremdzellen geben dem Lebergewebe eine unregelmäßige Form. Die Glykogenspeicher wirken deutlich uneinheitlicher als die der Wasserkontrollen. x 750

Abb. 59: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Ethinylestradiol:** Das Leberparenchym weist eine uneinheitliche Struktur auf. Der Glykogengehalt der Zellen ist stark unterschiedlich. Die Interzellularen sind leicht erweitert. 750 x

Abb. 60: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Kläranlagenablauf Großlappen:** Die intrazelluläre Gliederung ist deutlich ausgeprägt. Die Interzellularen sind leicht erweitert. Auffällig sind die Lipidfelder (Pfeile), die gegenüber der Wasserkontrolle wesentlich größer erscheinen. 750 x

Abb. 61: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Kläranlage Großlappen mit Arkopal N-150®-Zusatz:** Die intrazelluläre Gliederung ist mit der von Abb. 60 vergleichbar, jedoch ist die Glykogenmenge etwas höher. 750 x

Wasserkontrollen

Bereits im Lichtmikroskop wiesen die Hepatocyten der Kontrolltiere eine klare Gliederung in den Kern enthaltendes zentrales Cytoplasma (helle Bereiche) und ausgedehnte periphere (dunklen) Speicherareale auf (Abb. 57). Die weitere Auswertung zeigte ein verhältnismäßig inhomogenes Leberparenchym. Interzellullarräume kamen häufig vor, ebenso vereinzelte ins Parenchym eingewanderte Makrophagen. Der Zellkern nahm eine peripher leicht verlagerte Position ein und war bisweilen von unregelmäßiger Form. Im Zellkern war relativ wenig, jedoch auffällig kondensiertes Heterochromatin um den deutlich ausgeprägten Nucleolus und in der Kernperipherie zu finden (Abb. 62).

Nächste Seite

Abb. 62: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Wasserkontrolle:** Auffällig sind die großen Glykogenspeicher und der zentral liegende Kern mit dem großen Nucleolus. Der Golgi-Apparat ist bei dieser Zelle für eine Kontrollhepatocyte ungewöhnlich stark ausgebildet. 7.200 x

Abb. 63: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Wasserkontrolle:** Der Golgi-Apparat zeichnet sich durch 3-4 dicht aneinander liegende, leicht fragmentierte Zisternen aus, die nur wenig Vesikel abschnüren. Die Nähe zum Gallencanaliculus ist klar erkennbar. 17.000 x

Abb. 64: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Ethanolkontrolle:** Die Glykogenspeicher sind nicht als große Felder organisiert, sondern liegen in kleinen Bereichen über den ganzen Zellquerschnitt verteilt. 9.000 x

Abb. 65: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Ethanolkontrolle:** Die Zisternen des Golgi-Apparats sind nur mäßig ausgebildet und fragmentiert. Die Aktivität erscheint sehr gering. 26.000 x

Die Glykogenspeicher waren in der Regel sehr groß und wiesen eine hohe Dichte auf. Der Glykogenspeicher setzte sich aus 3-4 kleinen Feldern zusammen, die voneinander durch Cytoplasmabrücken getrennt waren. Diese Cytoplasmabereiche beherbergten die von einzelnen Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) umschlossenen Mitochondrien sowie vereinzelte Myelinwirbel und lysosomale Elemente. Um den Zellkern lag eine ausgeprägte Schicht organellenhaltigen Cytoplasmas, das den Hauptanteil des rER enthielt. Das in verhältnismäßig geringen Mengen vorhandene rER lag in 3-4 parallelen Zisternen übereinander geschichtet. Eine deutliche Stapelbildung war selten. Die Zisternen des rER waren oft unregelmäßig geformt und wiesen eine leichte Fragmentierung auf.

Die großen Mitochondrien waren häufig mit dem rER eng assoziiert. Sie besaßen überwiegend eine ovale bis längliche Form und enthielten intramitochondriale Granula. Peroxisomen traten in geringer Anzahl um den Zellkern auf und zeigten nur geringe Katalaseaktivität. Zisternen des glatten endoplasmatischen Retikulums (sER) waren regelmäßig vorhanden und meistens in der Nähe des Golgi-Apparates zu finden. Der Golgi-Apparat war in der Regel zwischen Zellkern und Gallencanaliculus lokalisiert und bestand zumeist aus mehreren Dictyosomen, die sich aus Stapeln von bis zu 5 parallelen Zisternen zusammensetzten (Abb. 63). Insgesamt wiesen sie aber nur eine geringe Vesikelbildung und damit geringe Aktivität auf. Lysosomale Elemente waren selten. Lipidspeicher kamen meistens in Form eines einzigen großen Lipidtropfens im Zellquerschnitt vor. Dieser war gelegentlich seitlich von einer Ansammlung myelinartiger Matrix („Leaflet“) begrenzt.

Alkoholkontrolle

Die Hepatocyten der mit Ethanol behandelten juvenilen Karpfen wiesen nur wenige Unterschiede zur Wasserkontrolle auf.

Auffällig war, dass nur bei zwei von sechs untersuchten Individuen eine klare Trennung zwischen peripheren Speicherarealen und zentralem Cytoplasma zu finden war. Die Glykogenspeicher der übrigen Tiere waren klein und über den gesamten Zellquerschnitt in das Cytoplasma eingestreut (Abb. 64). Dieser Umstand führte zu einer deutlichen Verringerung der intrazellulären Gliederung.

Der Kernumriss war insgesamt gleichmäßiger als bei den Kontrolltieren, unterschied sich sonst jedoch weder in Heterochromatinmenge noch in Anzahl und Größe der Nucleoli. Die Menge der Peroxisomen war leicht erhöht. Auch die Zisternen des rER unterlagen der Anordnung der Glykogenspeicher und waren mehr oder weniger ungeordnet in der Zelle verteilt (Abb. 64). Die Zisternen des rER lagen bei den Alkoholkontrollen nur selten parallel, waren deutlich fragmentiert und leicht dilatiert. Auch der Golgi-Apparat war als Folge der Kompartimentierungsstörung weniger stark ausgeprägt als bei den Kontrollen (Abb. 65). Die Zisternen waren kürzer, deutlich fragmentiert und zeigten eine geringere Aktivität (geringere Anzahl abgeschnürter Vesikel). Die Menge der lysosomalen Elemente war leicht erhöht.

1 µg/L Nonylphenol

Auch bei Belastung mit 1 µg/L Nonylphenol waren nur wenige Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren zu beobachten, die jedoch im Hinblick auf die Veränderungen bei den höheren Nonylphenolkonzentrationen ein eindeutiges Symptom darstellen.

Die Zellen lagen dicht aneinander, jedoch waren eine ganze Reihe erweiterter Interzellularen zu beobachten, die häufig mit Makrophagen infiltriert waren. Deshalb war das Leberparenchym insgesamt heterogener als bei den Kontrollen. Die intrazelluläre Gliederung war dagegen mit den Kontrollen vergleichbar, allerdings waren die Glykogenspeicher kleiner und lagen etwas verstreuter. Auffällig waren die deutlich kleineren Nucleoli der Zellkerne (Abb. 66). Die auffälligsten Veränderungen gegenüber den Wasserkontrollen waren am Proteinbildungsapparat zu beobachten. Das rER verfügte über eine vergrößerte Oberfläche, die durch eine erhöhte rER-Menge, aber auch durch einen höheren Fragmentierungsgrad erreicht wurde. Der Golgi-Apparat zeichnete sich durch 3-4 langgestreckte und wenig fragmentierte Zisternen aus (Abb. 67). Die Dictyosomenmenge, wie auch deren Aktivität, war gegenüber den Kontrolltieren erhöht.

Bei dieser Konzentration konnte ein verstärktes Auftreten lysosomaler Elemente festgestellt werden. Lysosomen kamen in allen Entwicklungsstufen (primär, sekundär, tertiär) vor. Auch Autophagosomen waren regelmäßig vorhanden. Im Gegensatz zu der verringerten Glykogenmenge nahm die Lipidmenge zu. Im Unterschied zu den Kontrollen waren die Lipidtropfen jedoch von keinem Leaflet umgeben. In den Gallencanaliculi war kein Myelin zu finden.

10 µg/L Nonylphenol

Das Leberparenchym erschien kompakt. Interzellularräume waren kaum festzustellen (Abb. 68). Makrophagen kamen regelmäßig vor, jedoch befanden sich diese meistens in den Sinusoiden. Die Hepatocyten wiesen eine polygonale Form auf und schienen leicht aufgebläht. Die intrazelluläre Gliederung war stark ausgeprägt. Die auffallend großen und zusammenhängenden Glykogenfelder besaßen eine hohe Dichte und ließen für das den Kern enthaltende zentrale sowie das periphere Cytoplasma nur wenig Raum (Abb. 689). Der Kern enthielt etwas weniger Heterochromatin als die Kontrollhepatocyten und auch die Nucleoli waren kleiner, allerdings nicht so klein wie in der niedrigsten Konzentration.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 66: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **1 µg/L Nonylphenol:** Das Leberparenchym ist insgesamt heterogener als bei den Kontrollen. Das rER verfügt über eine vergrößerte Oberfläche, die durch eine erhöhte rER-Menge, aber auch durch einen höheren Fragmentierungsgrad erreicht wird. 6.700 x

Abb. 67: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **1 µg/L Nonylphenol:** Der Golgi-Apparat zeichnet sich durch 3-4 langgestreckte und wenig fragmentierte Zisternen aus. 18.500 x

Abb. 68: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **10 µg/L Nonylphenol:** Das Leberparenchym ist von kompakter Gestalt. Die sehr großen zusammenhängenden Glykogenfelder weisen eine hohe Dichte auf und lassen für das den Kern enthaltende zentrale und das periphere Cytoplasma nur wenig Raum. 3.500 x

Abb. 69: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **10 µg/L Nonylphenol:** Der Golgi-Apparat besteht aus 4-5 langgestreckten Zisternen, die sehr dicht aufeinander liegen. Die Mitochondrien zeichnen sich durch eine erhöhte Heterogenität aus. Neben sehr langgestreckten sind auch „tallierte“ Formen zu beobachten (Pfeilköpfe). 17.800 x

Die Mitochondrienmenge war leicht verringert und von höherer Heterogenität. Neben ovalen bis nierenförmigen Mitochondrienanschnitten fanden sich auch häufig sehr langgestreckte und „tallierte“ Formen (Abb. 69). Die Menge des rER war vergleichbar mit Hepatocyten bei einer Belastung mit 1 µg/L Nonylphenol, jedoch mit wesentlich höherer Neigung zur Stapelbildung und fragmentierten Zisternen. Die Dictyosomenmenge war deutlich höher als die der Kontrolle und auch gegenüber der niedrigsten Konzentration erhöht. Der Golgi-Apparat bestand aus 4-5 Zisternen, die sehr dicht aneinander lagen (Abb. 69) und kaum fragmentiert waren. Die Aktivität des Golgi-Apparates wies keine Unterschiede zur Belastung mit 1 µg/L Nonylphenol auf. Im Gegensatz zu dieser waren hier bezüglich der Lysosomen kaum Unterschiede zur Kontrolle festzustellen.

15 µg/L Nonylphenol

Von allen untersuchten Versuchstieren wiesen die Lebern der Tiere bei 15 µg/L Nonylphenol die stärksten individuellen Unterschiede auf.

Schon die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte ein Leberparenchym von hoher Heterogenität (Abb. 58). Die Interzellularen waren erweitert und mit einer beträchtlichen Zahl von Fremdzellen infiltriert. Im Gegensatz zum uneinheitlichen Parenchym konnte bei den einzelnen Zellen in der Regel eine klare intrazelluläre Gliederung beobachtet werden. Die Glykogenspeicher waren in großen Feldern organisiert, die Abgrenzung zum organellenhaltigen Cytoplasma erschien deutlich ausgeprägt (Abb. 70). Die Zellkerne wiesen einen auffällig unregelmäßigen Umriss auf; unterschieden sich aber weder in Heterochromatinmenge noch in der Ausprägung der Nucleoli von denen der Kontrolltiere. In dieser Konzentration fand erstmals eine leichte Vermehrung der Mitochondrien statt, wobei gleichzeitig die Anzahl der intramitochondrialen Granula zurückging.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 70: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **15 µg/L Nonylphenol:** Im Gegensatz zum uneinheitlichen Parenchym weisen die einzelnen Zellen in der Regel eine klare intrazelluläre Gliederung auf. Die Glykogenspeicher sind in großen Feldern organisiert, die Abgrenzung zum organellenhaltigen Cytoplasma ist deutlich. Die rER-Zisternen liegen in Stapeln von bis zu 11 parallelen Zisternen überwiegend in Kernnähe. Außerdem ist bei den meisten Individuen eine ausgeprägte Dilatation der rER-Zisternen zu beobachten. 6.800 x

Abb. 71: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Ethinylestradiol:** Die Glykogenspeicher haben sehr unterschiedliche Größen und zeigen einen äußerst unregelmäßigen Umriss. Auffällig sind auch die leicht erweiterten Interzellularen. 3.000 x

Abb. 72: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Ethinylestradiol:** Das Glykogen tritt vor dem sehr stark ausgeprägten Cytoplasma deutlich zurück. Die Zisternen des rER liegen in Stapeln von bis zu 25 parallelen Zisternen nebeneinander und reichen oft von der Kernmembran bis an die Zellmembran. Das Parenchym ist häufig mit Makrophagen infiltriert. 6.500 x

Abb. 73: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Ethinylestradiol:** Der Golgi-Apparat erstreckt sich über ein großes Areal und besteht aus vielen langgestreckten Zisternen, die auffällig viele elektronendichte Vesikel abschnüren. 11.000 x

Auch die Menge der Peroxisomen war leicht erhöht. In der höchsten Konzentration zeigte sich das typische Bild einer Nonylphenolbelastung im Proteinbildungsapparat am deutlichsten: rER-Menge, Anordnung und Anzahl der parallelen Zisternen waren gegenüber den mit 10 µg/L Nonylphenol belasteten Hepatocyten erhöht, außerdem zeigte sich hier bei den meisten Individuen eine ausgeprägte Dilatation der rER-Zisternen.

Menge und Form der Dictyosomen war mit jenen der mit 10 µg/L Nonylphenol belasteten Fische vergleichbar. Allerdings war die Aktivität etwas erhöht. Die Lipidmenge war gegenüber den Kontrollen erhöht. Leaflets um die Lipidtropfen kamen regelmäßig vor; eine Felderbildung innerhalb der Lipidtropfen (Konfluenz) konnte aber auch hier nicht beobachtet werden. Die Anzahl der Makrophagen im Parenchym war bei den 6 untersuchten Individuen sehr unterschiedlich, so dass hier- ebenso bezüglich der lysosomalen Elemente- keine Aussage gemacht werden konnte.

17 α -Ethinylestradiol („Positivkontrolle“)

Schon bei geringer Vergrößerung war der sehr unterschiedliche Glykogengehalt der Zelle sowie die eigenartige Form der Glykogenfelder zu erkennen (Abb. 59). Sie waren von sehr heterogener Größe und besaßen einen unregelmäßigen Umriss. Das Glykogen trat gegenüber dem sehr stark ausgeprägten Cytoplasma deutlich zurück (Abb. 70). Die Hepatocyten schienen oft deformiert, jedoch blieb die intrazelluläre Gliederung erhalten. Dabei nahm das Cytoplasma zwischen 60-90 % des gesamten Zellquerschnitts ein und verdrängte die Glykogenspeicher überwiegend in die Peripherie (Abb. 71). Die Kerne besaßen eine unregelmäßige Form und die Nucleoli waren in der Regel etwas kleiner als bei den Kontrollen. Die Mitochondrien blieben unverändert, jedoch war ein Rückgang der intramitochondrialen Granula zu beobachten (Abb. 72). Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl der Peroxisomen zu.

Die stärkste Veränderung war jedoch die enorme Zunahme der rER-Menge. Die Zisternen lagen in Stapeln von bis zu 25 parallelen Zisternen nebeneinander und reichten oft von der Kernmembran bis an die Zellgrenzen (Abb. 71). Dabei fiel eine Neigung zur Wirbelbildung auf. Der Fragmentierungsgrad war gering; Dilatationen traten kaum auf. Auch die Dictyosomen erfuhren eine deutliche Zunahme (Abb. 72). Die Zisternen schnürten dabei auffällig viele dunkle Vesikel ab. Makrophagen kamen regelmäßig vor.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 74: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Kläranlagenablauf Großlappen:** Die Lipidmenge ist erhöht. Die Lipidspeicher sind immer von einem Leaflet umgeben und zeigen im Gegensatz zu allen anderen Versuchsgruppen eine Tendenz zur Akkumulation. 4.000 x

Abb. 75: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Kläranlagenablauf Großlappen:** Der Golgi-Apparat besteht aus 2-3 Zisternen und zeigt nur eine geringe Aktivität. 13.700 x

Abb. 76: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Kläranlage Großlappen mit Arkopal N-150[®]-Zusatz:** Eine geringfügige Erhöhung der rER-Menge, eine verstärkte Stapelbildung und deutlich mehr parallele Zisternen sind zu beobachten. Dafür ist das rER auch etwas stärker fragmentiert und dilatiert. 4.400 x

Abb. 77: Karpfen (*Cyprinus carpio*), **Kläranlage Großlappen mit Arkopal N-150[®]-Zusatz:** Der Golgi-Apparat weist 3-4 leicht fragmentierte Zisternen auf, die mehrere elektronendichte Vesikel ab-schnüren. 15.000 x

Kläranlagenablauf Großlappen und Arkopalversuch

Die Hepatocyten beider Gruppen aus der Kläranlage waren im Vergleich mit den übrigen Karpfen auffällig kleiner (Abb. 73 und 75). Intrazelluläre Gliederung und Parenchymheterogenität konnten jedoch mit der Wasserkontrolle verglichen werden. Bei beiden Kläranlagengruppen war der Kernumriss wesentlich gleichmäßiger und die Nucleoli waren kleiner als bei den Wasserkontrollen. Die auffallend großen Mitochondrien wiesen nur eine geringe Heterogenität auf. Peroxisomenmenge und Lipidgehalt waren erhöht. Um die Lipidspeicher fand sich stets ein Leaflet. Die Lipidspeicher zeigten im Gegensatz zu allen anderen Versuchsgruppen eine Organisation in Feldern.

Gemeinsam war den *Großlappener* Versuchsgruppen eine verringerte Ausprägung der Golgi-Zisternen sowie eine leicht erhöhte Aktivität des Golgi-Apparates (Abb. 74 und 76). Zusätzlich wiesen die Tiere des Arkopalversuchs eine leichte Zunahme der Dictyosomenmenge, sowie eine etwas stärkere Fenestrierung der Golgi-Zisternen auf. Ferner war bei diesem Versuchsansatz eine leichte Erhöhung der rER-Menge, eine verstärkte Stapelbildung und deutlich mehr parallele Zisternen zu beobachten, was mit dem Erscheinungsbild der mit 15 µg/L Nonylphenol belasteten Hepatocyten vergleichbar ist. Allerdings erschien das rER auch etwas stärker fragmentiert und dilatiert.

Die *Großlappener* Karpfen zeigten außerdem eine leichte Vermehrung der lysosomalen Elemente. Auffallend war für beide Versuchsgruppen auch das häufige Auftreten von Fremdzellen.

4.4 Diskussion

Die vorangegangene Untersuchung belegt, dass durch die Exposition gegenüber den Abläufen von Kläranlagen in unterschiedlichem Maße ein Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts hervorgerufen werden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Belastung mit Nonylphenol bzw. Ethinylestradiol als Monosubstanz wesentlich stärkere Effekte verursacht als die komplexe Matrix eines Kläranlagenablaufs. In Bezug auf den Versuchsansatz in der Kläranlage Starnberger See ist jedoch einzuschränken, dass intraperitoneale oder intramuskuläre Injektionen wohl kaum der Aufnahme durch den Organismus in der aquatischen Umwelt entsprechen und daher die verursachten Effekte nur bedingt vergleichbar sind. Darüber hinaus sind die bei den Injektionen verwendeten Konzentrationen in keiner Weise umweltrelevant.

Juvenile Karpfen reagieren nach Belastung mit Nonylphenol mit einem dosisabhängigen Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts sowie mit Veränderungen in der Ultrastruktur der Leber. Während bei den Vitellogeninmessungen mit dem Western Blot erst ab einer Konzentration von 10 µg/L Nonylphenol ein signifikanter Effekt zu beobachten war, können in der ultrastrukturellen Analyse bereits bei einer Belastung mit 1 µg/L Nonylphenol deutliche dosisabhängige Effekte beobachtet werden.

Bei den mit Nonylphenol belasteten Tieren konnten bei vielen Merkmalen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass bei allen Versuchsgruppen verstärkt Makrophagen in das Leberparenchym eingewandert sind. Diese Zunahme der Makrophagenaktivität kann als allgemeine Reaktion auf Belastung (Zellstress) angesehen werden (Braunbeck 1990a, Braunbeck & Völkl 1993).

Die bei der Lösungsmittelkontrolle gegenüber der Wasserkontrolle zu beobachtende verminderte intrazelluläre Gliederung sowie die Abnahme der Glykogenspeicher wird von vielen Autoren als eine frühe

unspezifische Reaktion auf die Belastung mit einer toxischen Substanz gewertet (Review s. Braunbeck 1998). Einerseits spiegelt die Abnahme zellulärer Reservestoffe einen erhöhten Energiebedarf der Zellen wider (Braunbeck 1992), andererseits weist die Zunahme der Peroxisomen- und Lysosomenmenge auf eine Zunahme des Zellstoffwechsels hin (Hawkes 1980; Hinton et al. 1978). Der Rückgang der intramitochondrialen Granula, die als Calcium und bedingt auch als Proteinspeicher angesehen werden, deutet ebenfalls auf eine Steigerung des Zellstoffwechsels hin. Die verringerte Ordnung des rERs korrespondiert mit der Abnahme der intrazellulären Gliederung. Die verstärkte Fragmentierung der rER-Zisternen führt zur Vergrößerung der aktiven Oberfläche, was zum einen ein Hinweis auf einen erhöhten Zellstress darstellt, zum anderen aber auch als Zeichen erhöhter Proteinbiosynthese gewertet werden kann (Braunbeck 1998).

Die am stärksten von der Nonylphenolkonzentration abhängigen Veränderungen zeigten sich im Proteinbildungsapparat. Am deutlichsten ist hier die Zunahme der rER-Menge und deren erhöhter Ordnungsgrad, welche bei den gegenüber 17α -Ethinylestradiol exponierten Tieren am deutlichsten war. Diese Zunahme kann als Indikator für eine verstärkte Proteinbiosynthese gewertet werden und steht sicher im Zusammenhang mit dem Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts in den höheren Konzentrationen (s. dazu 3. Kapitel). Bei den mit Nonylphenol belasteten Tieren kann zusätzlich eine progressive Fragmentierung der rER-Zisternen beobachtet werden. Die zunehmende Fragmentierung wird ebenso wie die leichte Dilatation der rER-Zisternen als unspezifische Anpassung des sehr sensibel auf suboptimale Bedingungen reagierenden rER angesehen (Réz 1986).

Der Golgi-Apparat unterliegt ebenfalls dosisabhängigen Veränderungen mit einer Steigerung von der niedrigsten Nonylphenolkonzentration bis zur Belastung mit Ethinylestradiol. Die Menge der Dictyosomen nimmt ebenso wie die Anzahl ihrer Zisternen bei abnehmender Fenestrierung der Zisternen stetig zu, andererseits erhöht sich die Aktivität der Golgi-Apparate. Auch diese Veränderungen sind ein Indikator für eine verstärkte (Lipo-) Proteinsynthese und -sekretion, die wahrscheinlich mit der Induktion der Vitellogeninsynthese in der Leber zusammenhängt (Peute et al. 1978, 1985).

Obwohl es viele Übereinstimmungen in der Reaktion der Zellen auf Nonylphenol und 17α -Ethinylestradiol gibt, nimmt das Estradiol dennoch eine Sonderstellung ein, da es nicht immer der nonylphenolinduzierten Dosis-Wirkungs-Beziehung folgt (keine Vermehrung der Golgi-Zisternen, fehlende Fragmentierung und Dilatation des rER).

Die Art und Ausprägung des glatten endoplasmatischen Retikulums (sER) ist außer bei der Positivkontrolle bei allen Versuchsansätzen unverändert. Die Erhöhung der sER-Menge deutet auf die Induktion von Biotransformationsprozessen hin und ist ein Hinweis auf das toxische Potential von Ethinylestradiol, da eine Proliferation des sER auch als cytologischer Marker für die Induktion von Detoxifikationsprozessen gilt (Braunbeck et al. 1989, Hacking et al. 1978, Hinton et al. 1978).

Während bei den Versuchsansätzen aus dem Labor die Ergebnisse sehr deutlich sind, lassen sich die Befunde der beiden *Großlappener* Versuchsansätze schwieriger interpretieren.

Die wesentlich ausgeprägteren Lipidspeicher in den Hepatocyten der Tiere aus dem Kläranlagenablauf *Großlappen* deuten auf einen etwas anderen Ernährungszustand der Tiere hin. Die erhöhte Peroxisomenmenge ist mit dem erhöhten Lipidstoffwechsel korreliert (Braunbeck 1992, 1998).

Bei den Tieren aus dem Ablauf der Kläranlage *Großlappen* ist nur eine sehr leicht erhöhte Proteinbiosynthese anzunehmen, da die Menge der rER- Zisternen und Dictyosomen nur geringfügig höher als bei den Wasserkontrollen war. Eine östrogene Wirkung des Kläranlagenausflusses kann daher kaum nachgewiesen werden, da auch die Messung des Plasma-Vitellogenin-Levels keine signifikant erhöhten Werte zeigte. Allerdings sind auch antagonistische Effekte anderer im Kläralagenablauf vorhandener Stoffe in Betracht zu ziehen, die eine leichte Östrogenwirkung möglicherweise überdecken.

Anders verhält es sich mit den Tieren aus dem Kläranlagenabwasser, dem die Industriechemikalie Arkopal N-150[®] zugesetzt wurde. Hier ist ein deutlicher Anstieg der rER-Menge, der parallelen Zisternen, sowie der Dictyosomen- Menge und der Golgi-Aktivität zu verzeichnen, Merkmale, die alle zusammen charakteristisch für eine östrogene Belastung sind (Peute et al. 1985). Auch wenn die Plasma-Vitellogeninwerte bei diesem Versuchsansatz nicht signifikant über denen der Kontrolltiere lagen, waren sie höher als bei den Tieren aus dem Kläranlagenablauf.

Insgesamt handelte es sich bei allen ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber der juvenilen Karpfen um adaptive Prozesse, welche mit einer Induktion der Vitellogeninsynthese zusammenhängen.

In beiden Versuchsansätzen aus der Kläranlage *Großlappen* war Nonylphenol laut chemischer Analyse nachweisbar (ca. 1 µg/L Nonylphenol im Kläranlagenablauf, ca. 10 µg/L Nonylphenol im Arkopalversuch). Wenn wir von einer wenigstens annähernden Vergleichbarkeit der Laborgruppen mit den Tieren aus der Kläranlage ausgehen, so muss von antagonistischen Stoffen im Kläranlagenablauf ausgegangen werden, da in den Laborversuchen schon ab 1 µg/L Nonylphenol eine deutliche Reaktion der Hepatocyten zu beobachten war. Mathiessen und Sumpter (1996) wiesen darauf hin, daß die östrogeninduzierten Effekte bei exponierten Organismen durch antiöstrogen oder androgen wirkende Substanzen abgeschwächt oder sogar blockiert werden können. Die Differenzierung dieser konkurrierenden Systeme ist vor allem im Hinblick auf die komplexen Ausflüsse von Kläranlagen schwierig (s. Kap. 9).

5. Untersuchungen zur Wirkung von Nonylphenol auf den Medaka (*Oryzias latipes*) im Life Cycle-Experiment

Zusammenfassung: Im Mittelpunkt dieser Studie stand die Untersuchung der Auswirkungen einer chronischen Belastung mit Nonylphenol auf Überleben, Reproduktionserfolg, Wachstum und Geschlechterverhältnis des Medakas. Dazu wurden zwei aufeinanderfolgende Generationen des Medakas mit 2, 20 und 50 µg/L Nonylphenol belastet. Als Positivkontrolle diente eine mit 100 ng/L 17β-Estradiol belastete Versuchsgruppe. In der F₁-Generation konnte nur bei einer Belastung mit 50 µg/L Nonylphenol und 17β-Estradiol, in der F₂-Generation dagegen ab Konzentrationen ≥ 20 µg/L eine erhöhte Larvalmortalität beobachtet werden. Ähnlich verhielt es sich bei der Mortalität nach dem Schlüpfen: In beiden Generationen war die Sterblichkeit bei Belastung mit 50 µg/L Nonylphenol und 17β-Estradiol erhöht. Allerdings war sie in der F₂-Generation im Vergleich zur F₁-Generation etwa zwei bzw. dreimal so hoch. Die Befruchtungsraten zeigten in beiden Generationen sowohl einen ausgeprägten dosisabhängigen Rückgang wie auch eine starke Abnahme des Befruchtungserfolgs von einer Generation zur nächsten. Das Geschlechterverhältnis verschob sich in der F₁-Generation von 57 bzw. 63 % Weibchen in den Kontrollen nach 71 % Weibchen bei einer Belastung ≥ 20 µg/L Nonylphenol sowie 97 % bei Belastung mit 17β-Estradiol. Außerdem traten in den gegenüber ≥ 20 µg/L Nonylphenol exponierten Medakas bei 2 bzw. 12 % der Individuen Zwittergonaden auf. Die Geschlechterverschiebung war in der F₂-Generation nicht so stark ausgeprägt und auch Zwittergonaden traten nicht auf. Die Messung der Vitellogenin-mRNA in der Leber ergab bei einer Belastung mit ≥ 20 µg/L Nonylphenol sowie 17β-Estradiol eine signifikante Zunahme. Auch die Leberultrastruktur zeigte nach Exposition gegenüber ≥ 2 µg/L Nonylphenol deutliche dosisabhängige Veränderungen, die im Wesentlichen in der Zunahme der rER-Menge verbunden mit einer erhöhten Fragmentierung der ER-Zisternen und einer Zunahme der Dictyosomenaktivität bestanden.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass eine Belastung von Medakas mit Nonylphenol signifikante physiologische und populationsrelevante Veränderungen verursacht. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Nonylphenol auf die Reproduktion und Mortalität der Medakas einen generationsübergreifenden Effekt ausübt.

5.1 Einleitung

In den letzten Jahren konnten zahlreiche negative Effekte von Nonylphenol auf reproduktionserrelevante Endpunkte wie verringerte Hodengröße (Jobling et al. 1996, Kinneberg et al. 2000) und verringerter Schlüpferfolg (Shihoda & Wakabayashi 2000) nachgewiesen werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt existieren nur wenige Untersuchungen über die Auswirkungen einer chronischen Belastung mit Nonylphenol und mögliche Multigenerationseffekte.

Zu diesem Zweck wurden im folgenden Life Cycle-Experiment Medakas ab 3-4 Stunden nach der Eibefruchtung bis zur Geschlechtsreife und darüber hinaus auch noch die darauffolgende Generation

mit 2, 20 und 50 µg/L Nonylphenol belastet. Während die Exposition der F₁-Generation im Durchfluss erfolgte, wurde die F₂-Generation statisch mit einem 14tägigen Wasserwechsel gehalten. Ziel der Studie war die Untersuchung der Auswirkungen einer Belastung mit Nonylphenol auf Reproduktionserfolg, Überleben, Geschlechterverhältnis, Vitellogenin-mRNA-Gehalt und ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber der F₁-Generation. Darüber hinaus sollte über eine Belastung der F₂-Generation auch die Veränderungen in weiteren Generationen untersucht werden, um so Aufschluß über mögliche Effekte über generationsübergreifende Effekte beim Medaka und somit über die ökologische Relevanz einer chronischen Belastung mit Nonylphenol zu erhalten.

5.2 Wirkung von Nonylphenol auf Entwicklung, Reproduktion, Geschlechterverhältnis und Leberultrastruktur des Medakas (*Oryzias latipes*)

5.2.1 Akute Toxizität (LC₅₀Test)

Als LC₅₀-Wert konnte für etwa 5 Tage alte Medakalarven nach einer Expositionszeit von 36 Stunden eine Konzentration von ca. 300 µg/L Nonylphenol ermittelt werden.

5.2.2 Chemische Analysedaten

Tab. 14: Realkonzentrationen von Nonylphenol im Life Cycle-Experiment mit dem Medaka (*Oryzias latipes*) während der Exposition der F₁-Generation im Durchfluss

Nominalkonzentration	1. Analyse	2. Analyse	3. Analyse
2 µg/L Nonylphenol	2,7 µg/L	2,8 µg/L	2,1 µg/L
20 µg/L Nonylphenol	22 µg/L	21 µg/L	20 µg/L
50 µg/L Nonylphenol	53 µg/L	48 µg/L	51 µg/L

Die Ergebnisse der über den Expositionszeitraum der F₁-Generation durchgeführten Analysen zeigen, dass das verwendete System die Realkonzentrationen sehr genau auf die Nominalwerte einstellt. So konnte für Konzentrationen ≥ 20 µg/L Nonylphenol eine durchschnittliche Schwankung von ± 1-5 %, für 2 µg/L Nonylphenol eine Schwankung von +26 % festgestellt werden.

5.2.3 Wachstum der F₁- und F₂-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol bzw. 17 β -Estradiol

Der Längenvergleich zeigte in der F₁-Generation weder zwischen den Geschlechtern noch zwischen den einzelnen Versuchsgruppen signifikante Unterschiede. Eine Ausnahme stellte die Beobachtung dar, dass die Weibchen aus der DMSO-Kontrolle auffällig klein und schwer waren.

Die Weibchen waren generell etwas schwerer als die Männchen, wobei der Gewichtsunterschied zwischen den beiden Geschlechtern nur bei der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle signifikant war. Im übrigen waren die Weibchen unter Belastung etwas leichter als die unbelasteten. Dagegen waren bei den Männchen kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ausgeprägt.

Die Tiere der F₂-Generation waren aufgrund ihres geringeren Alters (Versuchsauflösung in der 13. Woche, in der F₁-Generation in der 18. Woche) durchschnittlich etwa 1 cm kleiner als die Fische der F₁-Generation. Auch in der F₂-Generation konnten weder signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern noch zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden.

Ebensowenig konnten auffällige Gewichtsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden. Im Vergleich mit der F₁-Generation fallen jedoch die deutlich größeren Standardabweichungen in den Versuchsgruppen der F₂-Generation auf, was auf einen weniger homogenen Ernährungszustand hinweist.

5.2.4 Entwicklung und Reproduktionserfolg der F₁- und F₂-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol bzw. 17 β -Estradiol

Alle Tiere der F₁-Generation erreichten nach etwa 12 Wochen die Geschlechtsreife. Eine weitere mit 100 μ g/L Nonylphenol belastete Versuchsgruppe überlebte den Zeitpunkt des Schlüpfens nicht.

Die Befruchtungsraten betrug bei allen Versuchsgruppen der F₁-Generation knapp über 90 % (Tab. 15). Außerdem konnte kein Unterschied in der Gesamt-Larvalmortalität (= Mortalität von der Befruchtung bis 1 Woche nach dem Schlüpfen) bis zu einer Konzentration von 20 μ g/L Nonylphenol beobachtet werden. Erst bei 50 μ g/L Nonylphenol stieg die frühe Larvalmortalität (= Mortalität von der Eibefruchtung bis zum Schlüpfen) von ca. 25 % auf 27,3 % an. Die Larvalmortalität der Positivkontrolle 17 β -Estradiol stieg auf einen vergleichbaren Wert von 29,2 % (Abb. 78).

In Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle lag auch die Mortalität der in die Aquarien (Durchfluss) eingesetzten Larven erst ab einer Konzentration von 50 μ g/L Nonylphenol bzw. 100 ng/L 17 β -Estradiol mit Werten von 18,7 % bzw. 19,6 % deutlich höher (Tab. 15; Abb. 80). Insgesamt war die Mortalität damit im Lebensabschnitt nach dem Schlüpfen wesentlich niedriger als vor dem Schlüpfen. Die relativ hohe Ausfallrate in den Wasserkontrollen ist in Anbetracht der Befunde aus den anderen Life Cycle-Experimenten (s. Kapitel 6 und 7) sicher als Ausreißer zu betrachten.

5. Life Cycle-Experiment Nonylphenol

Tab. 15: Veränderungen in der Zusammensetzung der F₁-Generation des Medaka (*Oryzias latipes*) nach kontinuierlicher lebenslanger Belastung mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol

F ₁ -Generation		Wasser		DMSO		Octylphenol				100 ng/L 17β-Estradiol			
						2 µg/L		20 µg/L		50 µg/L			
		n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Petrischalen	Eingesetzte Eizahl	45		76		84		80		69		80	
	Unbefruchtete Eier *	5	6,87	6	7,89	7	8,33	5	6,25	3	4,35	8	10
	Befruchtete Eier *	40	93,13	70	92,11	77	91,67	75	93,75	66	95,65	72	90
	Mortalität vor dem Schlüpfen **	8	20	17	24,29	9	11,69	10	13,33	7	10,61	12	16,67
	Frühe Larvmortalität **	2	5	0	0	10	12,99	6	8	11	16,67	9	12,5
	Gesamt-Larvalverluste **	10	25	17	24,29	19	24,68	16	21,33	18	27,27	21	29,17
Aquarien	Eingesetzte Larven	30	66,67	53	69,74	58	69,05	59	73,75	48	69,57	51	63,75
	Mortalität ab Schlupf ***	4	13,33	0	0,00	1	1,72	2	3,39	9	18,75	10	19,61
	Größe Endpopulation	26	65,00	53	75,71	57	74,03	57	76,00	39	59,09	41	56,94
	Gesamt mortalität ****	14	35,00	17	24,29	20	25,97	18	24,00	27	40,91	31	43,06
F ₂ -Generation		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Petrischalen	Eingesetzte Eizahl	94		128		151		85		92		106	
	Unbefruchtete Eier *	15	15,96	18	14,06	24	15,89	25	29,41	28	30,43	35	33,02
	Befruchtete Eier *	79	84,04	110	85,94	127	84,11	60	70,59	64	69,57	71	66,98
	Mortalität vor dem Schlüpfen **	2	2,53	6	5,45	4	3,15	8	13,33	10	15,63	14	19,72
	Frühe Larvmortalität **	3	3,80	5	4,55	6	4,72	10	16,67	10	15,63	18	25,35
	Gesamt-Larvalverluste **	5	6,33	11	10,00	10	7,87	18	30,00	20	31,25	32	45,07
Aquarien	Eingesetzte Larven	74	93,67	99	90	117	92,13	42	70	44	68,75	39	54,93
	Mortalität ab Schlupf ***	13	17,57	17	17,17	12	10,26	7	16,67	17	38,64	22	56,41
	Größe Endpopulation	61	77,22	82	74,55	105	82,68	35	58,33	27	42,19	22	30,99
	Gesamt mortalität ****	18	22,78	28	25,45	22	17,32	25	41,67	37	57,81	49	69,01

* in Bezug auf die eingesetzte Eizahl; ** in Bezug auf die befruchteten Eier; *** in Bezug auf die in die Aquarien eingesetzten Larven; **** Zahl der eingesetzten Larven - Zahl der adulten Tiere (Endpopulation)

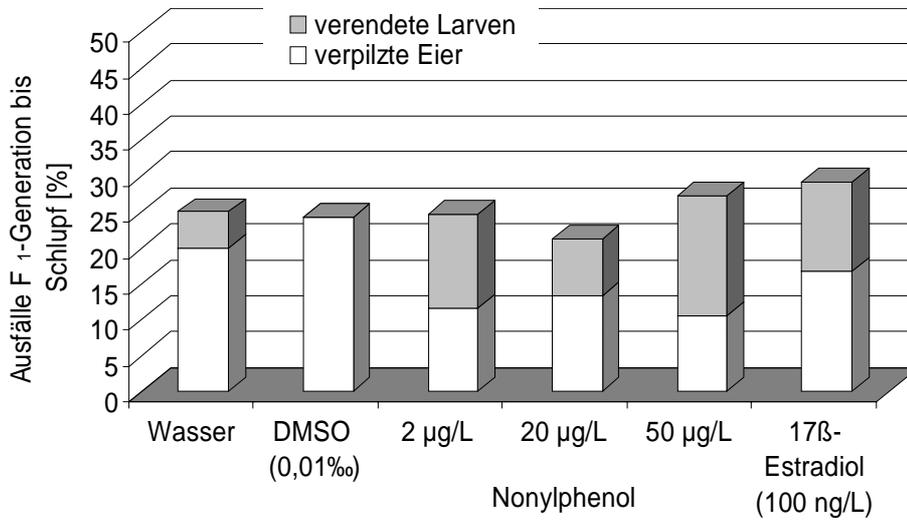


Abb. 78: Mortalität der F₁-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) unter Belastung mit 4-Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol bis 1 Woche nach dem Schlüpfen.

Die Mortalität der F₁-Generation des Medakas belief sich sowohl in den Kontrollen, als auch in den gegenüber Nonylphenol exponierten Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum bis zu einer Konzentration ≤ 20 µg/L auf ca. 25 %. Erst bei Belastung mit 50 µg/L Nonylphenol und bei der Positivkontrolle stieg die Gesamtmortalität auf 47,6 bzw. 44,6 % an (Tab. 15).

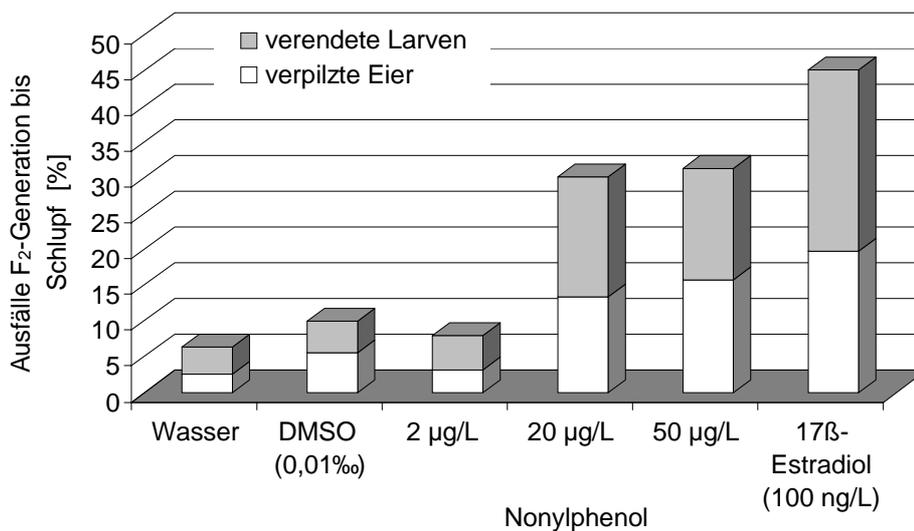


Abb. 79: Mortalität der F₂-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) unter Belastung mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol bis 1 Woche nach dem Schlüpfen.

In der F₂-Generation belief sich die Gesamtmortalität bis zum Schlupf bei den Kontrollen und in der Gruppe von 2 µg/L Nonylphenol auf maximal 10 %, stieg jedoch bei den gegenüber 20 und 50 µg/L Nonylphenol exponierten Medakas auf 30 % an. In der Positivkontrolle betrug die frühlarvale Mortalität sogar 42,1 % (Abb. 79). Es konnte kein Zusammenhang zwischen Verpilzungsrate und chemischer Belastung festgestellt werden. Die Zunahme der Verluste beruhte ausschließlich auf einen Anstieg infektionsunabhängiger Mortalität (Tab. 15). Die dosisabhängige Zunahme der Mortalität setzte sich in der F₂-Generation des Medakas auch nach dem Schlüpfen fort: Während in den Kontrollen sowie in den mit 2 µg/L und 20 µg/L Nonylphenol belasteten Versuchsgruppen nach dem Schlüpfen zwischen 10 und 18 % der in die Aquarien eingesetzten Individuen starben, stieg der Wert bei 50 µg/L Nonylphenol auf 38,6 % an. Die postlarvale Mortalität betrug in der Positivkontrolle sogar 50 % (Tab. 15; Abb. 80). Im Gegensatz zur F₁-Generation, bei der die Mortalität nach dem Schlupf stets geringer war als vor dem Schlupf, lag die Mortalität der F₂-Generation nach dem Schlupf mit Ausnahme der 20 µg/L Nonylphenol-Gruppe immer höher als vor dem Schlüpfen (Abb. 79).

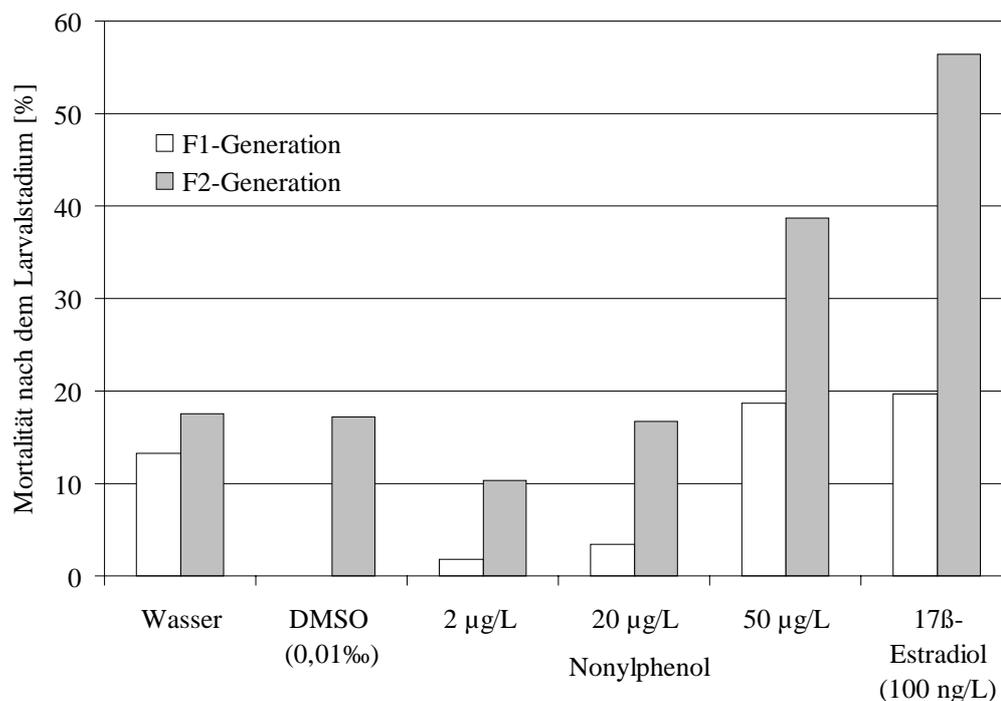


Abb. 80: Mortalität in der F₁- und F₂-Generation im Zeitraum vom 7. Tag nach dem Schlüpfen bis zur Geschlechtsreife.

5.2.5 Befruchtungserfolg der F₁- und F₂-Generation und Entwicklung der F₂-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung der F₁-Generation mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol

Im Unterschied zur F₁-Generation (Eier von unbelasteten Elterntieren; Befruchtungsrate in allen Gruppen > 90 %) zeigte die Befruchtungsrate in der F₂-Generation (Eier aus F₁-Generation) eine Abnahme von 78 - 85 % in den Kontrollen und den 2 µg/L Nonylphenol exponierten F₁-Medakas auf 70 % bei einer Belastung mit 20 und 50 µg/L Nonylphenol (Tab. 15, Abb. 85). Die Positivkontrolle zeigte in der F₂-Generation nur noch eine Befruchtungsrate von 71,7 %.

Auch hinsichtlich des Zeitraums bis zum Schlüpfen ergaben sich in der F₂-Generation signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und exponierten Gruppen (Tab. 16): Während bei Wasser- und DMSO-Kontrollen sowie den 2 µg/L Nonylphenol exponierten Medakas die ersten Larven am 14. Tag schlüpften, schlüpften bei den mit 20 und 50 µg/L belasteten Medakas die ersten Larven schon am 13. Tag. Eine noch stärkere Verkürzung des Zeitraums bis zum Schlüpfen konnte bei 100 ng/L 17β-Estradiol beobachtet werden, wo bereits am 9. Tag 25 % der Larven geschlüpft waren (Tab. 16). Während der Hauptteil der Larven aus Wasser- und DMSO-Kontrolle (70 bzw. 75 %) in der ersten Hälfte des gesamten Zeitraums schlüpften, schlüpfte der Hauptteil der mit Nonylphenol belasteten Tiere in der zweiten Hälfte der gesamten Schlüpfperiode.

Tab. 16: Anteil der geschlüpften Larven des Medakas (*Oryzias latipes*) in Prozent der pro Tag eingesetzten Eizahl. Die Hauptschlüpfstage in den einzelnen Konzentrationen sind grau unterlegt.

Tag	Wasser	DMSO	Nonylphenol			17β-Estradiol
			2 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 ng/L
9	-	-	-	-	-	25,5
10	-	-	-	-	-	9,8
11	-	-	-	-	-	11,8
12	-	-	-	-	-	13,7
13	-	-	-	3,4	4,2	19,6
14	13,3	17,0	1,7	6,8	-	2,0
15	30,0	15,1	-	8,5	14,6	17,6
16	26,7	13	6	33	4,2	-
17	-	30,2	31	15,3	29,2	-
18	13,3	17,0	24,1	25,4	20,8	-
19	-	1,9	34,5	5,1	27,1	-
20	16,7	3,8	1,7	1,7	-	-
21	-	1,9	-	-	-	-

5.2.6 Gelegegröße in der F₁- und F₂-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol

Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnte weder in der F₁- noch in der F₂-Generation ein auffälliger Unterschied in der durchschnittlichen Gelegegröße festgestellt werden. Ein eindeutiger, jedoch nicht konzentrationsabhängiger Trend kann hinsichtlich der maximalen Gelegegröße nachgewiesen werden (Abb. 81 und 82): Die maximale Gelegegröße zeigte in der F₁-Generation eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung. Während die maximale Gelegegröße bei Wasser- und DMSO-Kontrolle noch etwa 20 Eiern betrug, wurden von den mit 2 µg/L und 20 µg/L Nonylphenol belasteten Weibchen nur noch Gelege bis maximal 16 bzw. 17 Eier, von den mit 50 µg/L Nonylphenol und mit 100 ng/L 17β-Estradiol belasteten Weibchen der F₁-Generation sogar nur Gelege bis maximal 13 Eier erreicht (Abb. 81). Im Gegensatz dazu lagen die maximalen Gelegegrößen der F₂-Generation mit 17 bzw. 15 Eiern pro Gelege unter Belastung im Gegensatz zu den Kontrollen zwar niedriger, blieben jedoch unabhängig von der Schadstoffkonzentration auf einem ähnlichen Niveau (Abb. 82).

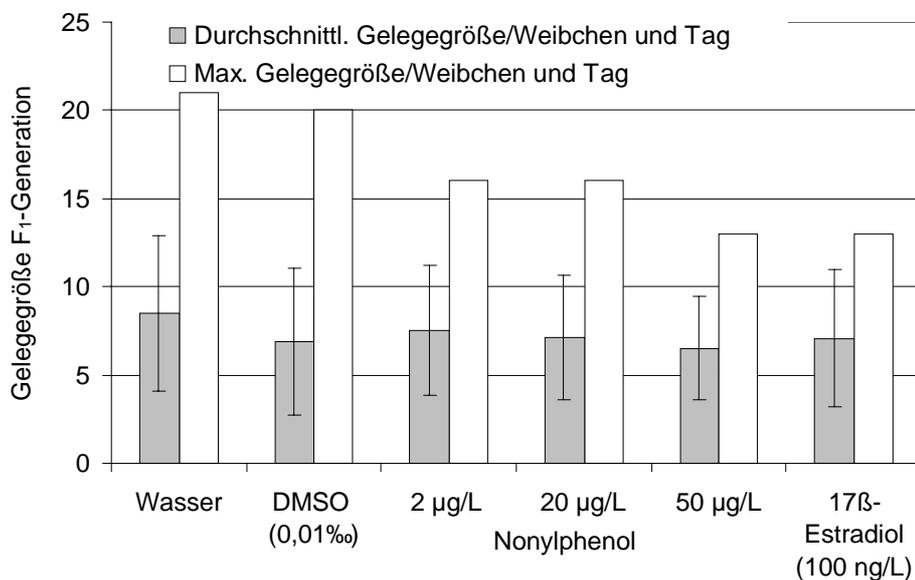


Abb 81: Durchschnittliche und maximale Gelegegröße in der F₁-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol.

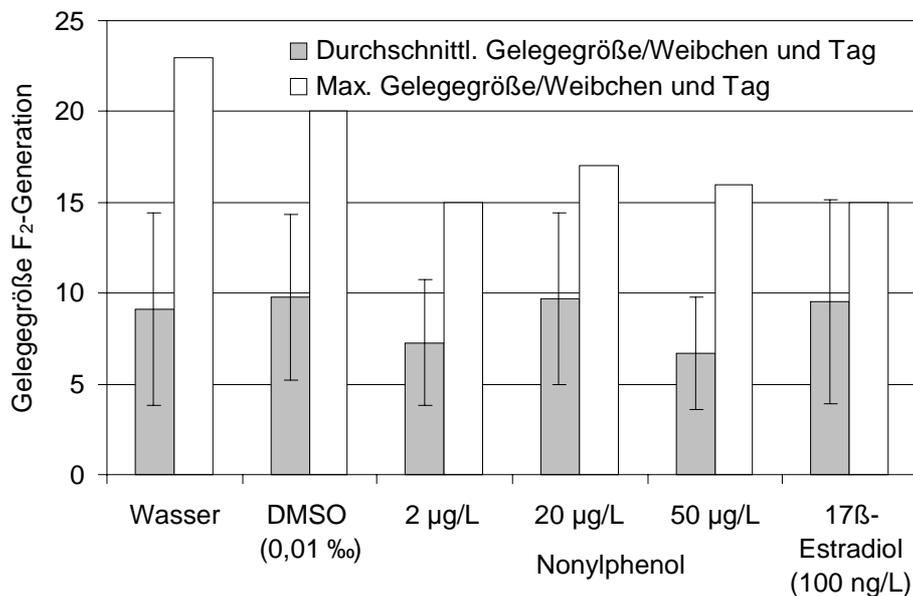


Abb. 82: Durchschnittliche und maximale Gelegegröße in der F₂-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol.

5.2.7 Geschlechterverhältnis der F₁- und F₂-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol

Die histologische Untersuchung der Gonaden der F₁-Generation ergab in Folge einer Belastung mit Nonylphenol bzw. 17β-Estradiol eine Erhöhung des Anteils von Weibchen an der Gesamtpopulation: Während in den Kontrollen nur 43 bzw. 37 % der Individuen Männchen waren, sank der Wert bei einer Belastung mit 2 µg/L Nonylphenol auf 29 % und bei Belastung mit 20 und 50 µg/L Nonylphenol auf 15 bzw. 17 % (Abb. 83). In der Positivkontrolle konnte eine nahezu völlige Verweiblichung beobachtet werden: Hier konnten nur noch 3 % der Individuen als Männchen identifiziert werden. Außerdem konnte in den gegenüber Konzentrationen ≥ 20 µg/L Nonylphenol exponierten Versuchsgruppen 3 bzw. 12 % Zwitter beobachtet werden. Im Gegensatz dazu traten Zwittergonaden bei der Positivkontrolle nicht auf (Abb. 83). Die mit Hilfe des χ^2 -Test durchgeführte Signifikanzberechnung ergab für alle schadstoffexponierten Gruppen einen signifikanten Unterschied zur Wasserkontrolle ($p < 0,001$).

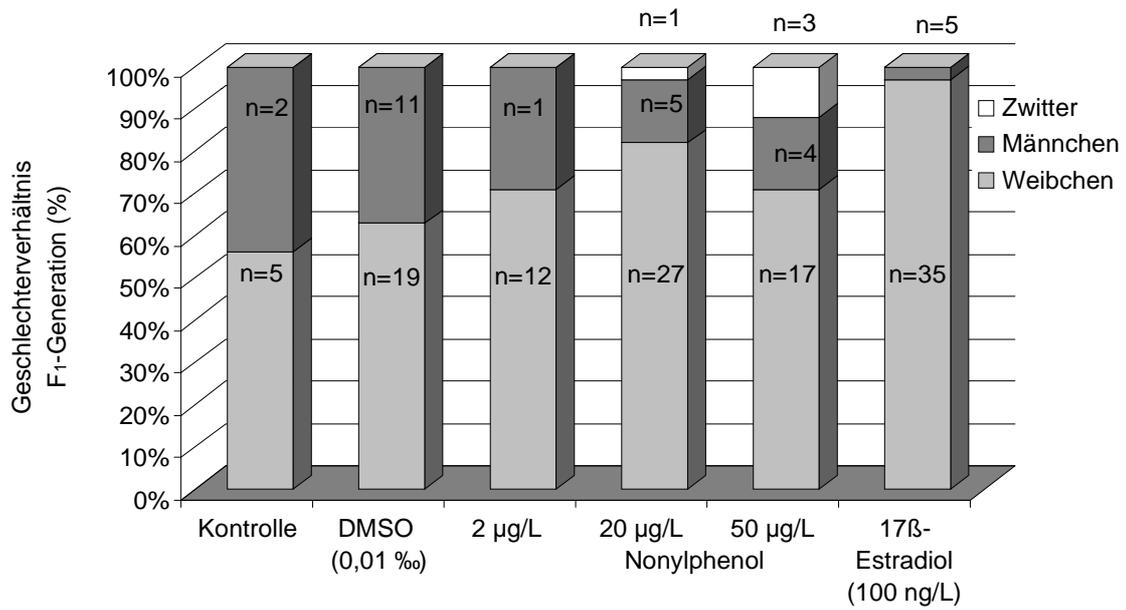


Abb. 83: Geschlechterverhältnis F₁-Generation Medaka nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol.

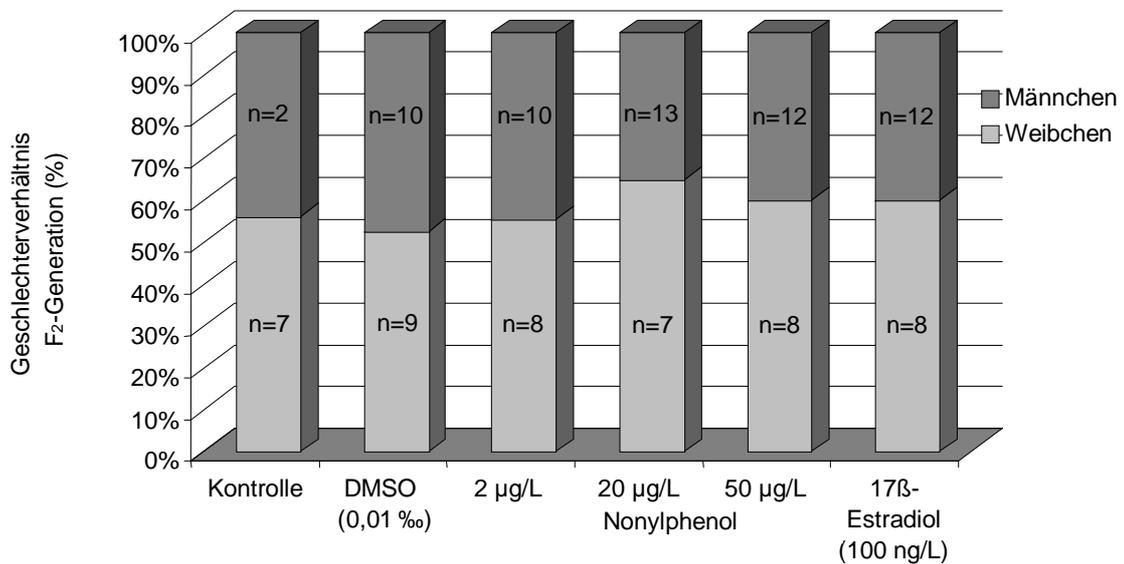


Abb. 84: Geschlechterverhältnis F₂-Generation Medaka nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol.

Ein anderes Bild ergab sich in der F₂-Generation. Auch hier zeigte sich eine Verschiebung zu einem höheren Anteil an Weibchen, jedoch war dieser Effekt bei weitem nicht so stark ausgeprägt wie in der F₁-Generation und konnte auch erst ab Konzentrationen $\geq 20 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol nachgewiesen werden (Abb. 84). Zwittergonaden traten nicht auf. Die mit Hilfe des χ^2 -Test durchgeführte Signifikanzberechnung ergab für die F₂-Generation keine signifikanten Unterschiede zur Wasserkontrolle.

5.2.8 Reproduktionserfolg der F₂-Generation: Effekte von Nonylphenol auf die Entwicklung in der F₃-Generation

Im Gegensatz zur Befruchtungsrates in der F₁- Generation (Eier unbelasteter Elterntiere) konnte in der F₂-Generation ab Konzentrationen $\geq 20 \mu\text{g/L}$ Nonylphenol ein Rückgang des Befruchtungserfolgs um durchschnittlich 18 % beobachtet werden. Deutlich stärker war die Befruchtungsrates in der F₃-Generation betroffen, in der sie von ca. 80 % in den Kontrollen über 56 % (2 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol) und 43 % (20 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol) auf 32 % bei jenen Medakas sank, die gegenüber 50 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol exponiert worden waren (Abb. 85). Die Befruchtungsrates der Positivkontrolle (100 ng/L 17 β -Estradiol) sank in der F₃-Generaton auf ca. 40 %. Vergleicht man die Befruchtungsrates über die drei untersuchten Generationen, so ergibt sich ein ausgeprägter generationsübergreifender Langzeiteffekt bei Belastung mit Nonylphenol (Abb. 85).

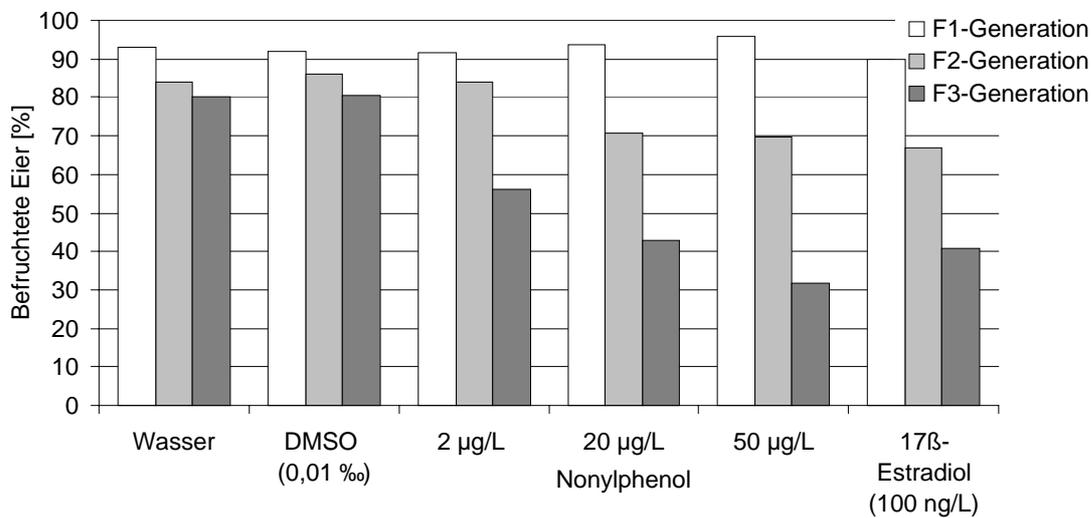


Abb. 85: Befruchtungsrates in F₁-, F₂- und F₃-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung der F₁- und F₂-Generation mit Nonylphenol bzw. 17 β -Estradiol.

5.2.9 Induktion der Vitellogenin-mRNA des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit Nonylphenol bzw. 17 β -Estradiol

Die Belastung männlicher Medakas mit Nonylphenol bzw. 17 β -Estradiol resultierte in einer dosisabhängigen Induktion der Vitellogenin-mRNA (Abb. 86). Bereits ab einer Belastung mit 20 μ g/L Nonylphenol konnte ein signifikanter Anstieg der Vitellogenin-mRNA in der Leber männlicher Medakas festgestellt werden. Sowohl bei der gegenüber 50 μ g/L Nonylphenol als auch der gegenüber 100 ng/L 17 β -Estradiol exponierten Versuchsgruppe konnte ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden ($p < 0,001$).

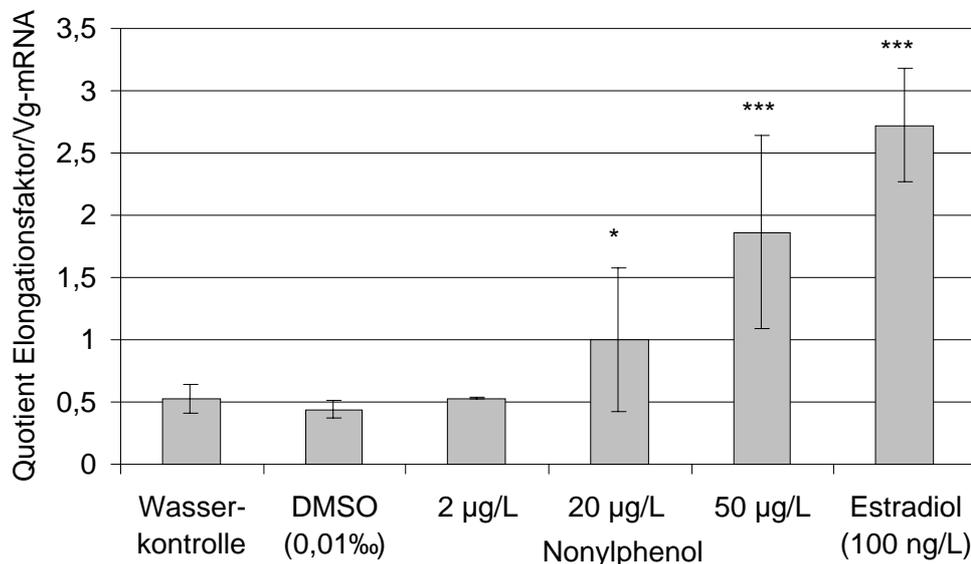


Abb. 86: Induktion der mRNA infolge Exposition gegenüber Nonylphenol bzw. 17 β -Estradiol bei männlichen Medakas. Angaben als Quotient der Bandenintensität aus Elongationsfaktor α 1 und Vitellogenin-mRNA (500 Bp). Signifikanz der Unterschiede zur Wasserkontrolle nach Student's T-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2.10 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger kontinuierlicher Exposition gegenüber Nonylphenol bzw. 17 β -Estradiol

Die Befunde der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber der männlichen bzw. weiblichen Medakas (*Oryzias latipes*) sind in den Tabellen 17 und 18 aufgelistet und semiquantitativ bewertet.

Tab. 17: Semiquantitative Analyse der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber weiblicher Medakas (*Oryzias latipes*, F₁) nach Exposition gegenüber Nonylphenol

		Wasser	DMSO	Nonylphenol			17β-Estradiol
			0,01 ‰	2 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 ng/L
Intrazelluläre Gliederung		+++	+++	++	+/+++	+++	++
Parenchymheterogenität		+++	+/++	++	++	++	++
Kern	regelmäßige Form	++	++	++	++	+++	+++
	zentrale Lage	+	++	++	++	+	+
	Heterochromatin	+	++	++	+++	+	+
	Nucleolus	++	+++	+	+/++	+++	+
Mitochondrien	Menge	++	++	+/+++	+/+++	+	+
	Größe	++	++	++	++	+	+
	Heterogenität	++	++	+	+	+	+
	intramitoch. Granula	-	-/+	+	-	-	+
Peroxisomen	Menge	+/+++	++	++	++	++	++
	Größe	+	+	+	+	++	+
rER	Menge	++	+/+++	+++	+++	+++/>++++	+++
	Stapel	++	+/+++	+++	+++	+++	++
	Paral. Zisternen	++	++	+++	+++	+++	+++
	Fragmentierung	+	+	+	+/+++	+/+++	++
	Dilatation	-	+	-	-/+	+	++
sER	Menge						
Golgi	Menge	++	++	+	++	++	++
	Zisternen	++	+	+	+	+	+
	Fenestrierung	+	++	++	++	+	++
	Aktivität	++	+	++	++	+++	+++
Lysosomen	Menge						
	primär	+	++	++	+	+	+
	sekundär	+	++	++	+	+	+
	Myelin	-	++	++	++	+	+++
	Vakuolen	+	+/+++	+/+++	+	+	+
„Myelin“ in Gallencan.	-	-	+	+	+	+++	
Lipid	Menge	++	++	+++	+/+++	+	++
	Lipidfelder	-	+	+++	+	+	+
	im Glykogen	+++	++	++	+	+	++
Glykogen	Menge	++	+	++	++	++	++
	part. Entspeicherung	-	-	-/+	+	-	-
Interzellularen	geschlossen	++	+++	++	++	++	++
	erweitert						
Fremdzellen	Makrophagen	-	+	+	++	+	+

- Merkmal fehlt
 + selten
 ++ Merkmal deutlich ausgeprägt
 +++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt
 ++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden bzw. ausgeprägt

■ nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen
 ■ leichter Unterschied zu den Kontrollen
 ■ deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

5. Life Cycle-Experiment Nonylphenol

Tab. 18: Semiquantitative Analyse der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber männlicher Medakas (*Oryzias latipes*, F₁) nach Exposition gegenüber Nonylphenol

		Wasser	DMSO	Nonylphenol			17β-Estradiol
			0,01 %	2 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 ng/L
Intrazelluläre Gliederung		+++	++/+++	+++	+++	++	+++
Parenchymheterogenität		+	+	+ / ++	+	+++	++/+++
Kern	regelmäßige Form	++	++	++	++	+	++/+++
	zentrale Lage	++	+	+	+	+	++
	Heterochromatin	+	++	++/+++	++/+++	+++	++
	Größe Nucleolus	++	+++	++	++	+	++
Mitochondrien	Menge	++	++	++	+++	++	++/+++
	Größe	++	++	+	++	++	++
	erweiterte Cristae	-	-	++	++	++	++
	Heterogenität	+	++	+++	+++	++/+++	+++
	intramitoch. Granula	+	-/+	++	++	+	+
Peroxisomen	Menge	++	+++	+++	+++	++	++
	Größe	++	++/+++	++	++	++	++
rER	Menge	+	+	++	++	++	++
	Stapel	+	+ / ++	++	++	++	++
	Paral. Zisternen	+	++	+++	++	++	++
	Fragmentierung	+	+	+ / ++	+ / ++	+++	++
	Dilatation	+	+	++	+	+	+
sER	Menge	+ / ++	+	+	+	-	+
	Lage im Glykogen	+	+	+	+	-	+
Golgi	Menge	+	+	+	+	+	+
	Zisternen	+ / ++	+	+	+	+	+
	Fenestrierung	+	++	++	++	++	+++
	Aktivität	+	+	+	+	++	+
Lysosomen	Menge	+ / ++	++	++	+	++	+++
	sekundär und tertiär	+	++	+ / ++	+	+	+
	Myelin	-	+	+	++	++	+
	Vakuolen	+ / ++	+	++	++	++	++
	„Myelin“ in Gallencan.	+	++	+	+	+	+
Lipid	Menge	++/+++	+ / ++	++	++	++	+
	Lipidfelder	++	+	+	++	+	+
	im Glykogen	++	++	+	++	+	+
Glykogen	Menge	++	++	+++	+++	++	+++
	part. Entspeicherung	-	-	-	-	+	+
Interzellularen	geschlossen	++	++	+++	+++	-	+++/-
Fremdzellen	Makrophagen	+	+	+	++	++	+

- Merkmal fehlt

+ selten

++ Merkmal deutlich ausgeprägt

+++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt

++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden bzw. ausgeprägt

 nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen

 leichter Unterschied zu den Kontrollen

 deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

Wasserkontrollen

Schon bei geringer Vergrößerung zeigt sich in den Lebern der Kontrolltiere eine klare intrazelluläre Gliederung in zentral um den Kern gelegene Cytoplasma- und peripher angeordnete Speicherareale. Dabei ist bereits bei geringer Vergrößerung eine klare Unterscheidung zwischen den Hepatocyten männlicher und weiblicher Fische möglich. Bei den Weibchen nimmt das den Kern umschließende Cytoplasma etwa 60 % der Zelle ein, während die Glykogenspeicher nur einen kleinen Teil des Zellquerschnitts ausmachen. Außerdem erschien das Leberparenchym der Weibchen aufgrund großer Interzellularräume recht inhomogen. Der Zellkern war bei den Weibchen häufig in die Peripherie verlagert. Er war von recht gleichmäßiger Form und besaß nur wenig Heterochromatin, jedoch stets einen großen Nucleolus. Die Hepatocyten der weiblichen Kontrolltiere waren von einem deutlich entwickelten Protein- und Lipoproteinsyntheseapparat geprägt (Abb. 87). Das rauhe endoplasmatische Retikulum (rER) erstreckte sich in großen Stapeln von bis zu 16 parallelen Zisternen bisweilen vom Kern bis in die Zellperipherie. Zwischen die Zisternen des rER eingestreut fanden sich zahlreiche gleichmäßige langgestreckte Mitochondrien sowie Peroxisomen. Häufig umgab eine einzelne Zisterne des rER ringförmig die Mitochondrien (Assoziation mit dem ER). Lysosomen kamen regelmäßig vor. Die verhältnismäßig zahlreichen Dictyosomen bestanden aus drei bis vier wenig fragmentierten Zisternen, wiesen jedoch geringe Aktivität auf (Anzahl und Größe der abgeschnürten Zisternen; Abb. 88). Kleine Glykogenfelder traten in Mehrzahl auf und besaßen oft Lipideinschlüsse.

Bei den männlichen Tieren wurden die Hepatocyten von großen Glykogenfeldern dominiert, welche einen erheblichen Teil der Zellperipherie ausfüllten. Dabei waren Lipideinschlüsse im Glykogen häufig. Die elektronenmikroskopische Auswertung zeigte ein homogenes Leberparenchym mit sehr wenig Fremdzellen. Die Hepatocyten waren von hexagonaler Gestalt und lagen dicht beieinander. Der Kern war regelmäßig gestaltet; er lag meist im Zentrum der Zelle (Abb. 90) und wies wenig Heterochromatin auf. Dagegen kamen Nucleoli häufig vor und waren verhältnismäßig groß.

Das den Kern umgebende Cytoplasma war bei den männlichen Medakas auf einen schmalen Saum um den Kern reduziert. Es enthielt wenig rER, das in unregelmäßigen Stapeln von maximal 7 parallelen Zisternen um den Kern lag. Zwischen die Zisternen des rER im kernnahen Cytoplasma waren zahlreiche kleine gleichförmige Mitochondrien eingestreut, welche stets eine deutliche Assoziation zum rER aufwiesen. Große Peroxisomen kamen häufig vor, dagegen waren lysosomale Elemente nur selten zu finden. Dictyosomen traten selten auf; sie waren oft klein und von geringer Aktivität.

Lösungsmittelkontrolle (0,02 % DMSO)

Die Hepatocyten der DMSO-exponierten Weibchen zeigten nur wenige Unterschiede gegenüber den Wasserkontrollen. Bei geringer Vergrößerung bestand das Leberparenchym aus dicht aneinander liegenden hexagonalen Zellen. Die Interzellularen waren geschlossen. Der Kern nahm meist eine zentrale Lage ein und verfügte über deutlich mehr Heterochromatin als die Zellen der Wasserkontrolle (Abb. 91). Die Anzahl der Peroxisomen war wie die rER-Menge leicht erhöht, dagegen wies der Golgi-Apparat eine geringere Aktivität als bei den Wasserkontrollen auf.

Die Hepatocyten männlicher Medakas in der DMSO-Gruppe besaßen vermehrt Peroxisomen und primäre Lysosomen, während die Lipidmenge zurückging (Abb. 89). Auch bei den Männchen war eine Zunahme des Heterochromatins im Zellkern zu beobachten. Auffällig war auch eine höhere Ordnung der Zisternen des in seiner Menge unveränderten rER. Die Menge der Dictyosomen blieb unverändert, allerdings erhöhte sich der Fragmentierungsgrad der Golgi-Zisternen.

2 µg/L Nonylphenol

Die mit 2 µg/L Nonylphenol belasteten Weibchen zeigten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nur wenige Veränderungen. Die auffälligste war die Zunahme der rER Menge, sowie eine regelmäßige Organisation. Das rER lag in Stapeln von bis zu 20 parallelen Zisternen zumeist in der Peripherie der Zelle. Der normalerweise den Kern umgebende Ring aus rER war mit maximal 3-4 parallelen Zisternen dagegen nur schwach ausgeprägt (Abb. 92). Auffällig war in dieser Versuchsgruppe die Assoziation des Lipids in Feldern sowie das Auftreten von myelinartigen Strukturen in den Gallencanaliculi. Die Mitochondrienmenge verringerte sich, dafür wiesen die Mitochondrien eine höhere Heterogenität auf.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 87: Medaka (*Oryzias latipes*) **Wasserkontrolle, ♂**; Bei den Kontrolltieren besteht eine klare Gliederung der Zelle in periphere Speicherareale und cytoplasmatische Bereiche mit einer großen Menge paralleler rER-Zisternen. Golgi-Apparate treten ebenso wie Lysosomen (Lys) regelmäßig auf. 11.000 x

Abb. 88: Medaka (*Oryzias latipes*) **Wasserkontrolle, ♀**; Die Golgi-Apparate der weiblichen Kontrolltiere zeigen eine regelmäßige Aneinanderreihung von bis zu vier wenig fragmentierten Zisternen. Die Aktivität (Menge der abgeschnürten Golgi-Vesikel) ist nur gering. 30.000 x

Abb. 89: Medaka (*Oryzias latipes*) **DMSO-Kontrolle, ♂**; Die männlichen Hepatocyten sind von hexagonaler Gestalt und besitzen eine klare intrazelluläre Kompartimentierung. Während die Lipidmenge sich verringert, ist die Menge der primären Lysosomen leicht erhöht. Das rER ist wesentlich gleichmäßiger als bei den Wasserkontrollen in Stapeln und parallelen Zisternen organisiert. 4.000 x

Abb. 90: Medaka (*Oryzias latipes*) **Wasserkontrolle, ♂**; Das Cytoplasma enthält wenig rER, das in unregelmäßigen Stapeln von maximal 7 parallelen Zisternen um den Kern liegt. In das rER des kernnahen Cytoplasmas sind zahlreiche Mitochondrien eingestreut, welche eine deutliche Assoziation zum rER aufweisen. Große Peroxisomen finden sich häufig, lysosomale Elemente und Dictyosomen sind selten. 8.000 x

Bei den Männchen wies der zumeist in die Peripherie verlagerte Zellkern deutlich mehr Heterochromatin auf. Im perinukleären Cytoplasma war als auffälligste Veränderung eine Zunahme des rER verbunden mit einer verstärkten Fragmentierung und Dilatation zu beobachten (Abb. 93). Die Zahl der rER-Stapel stieg von maximal 7 parallelen Zisternen in den Kontrollen auf bis zu 13 an. Zwischen die Zisternen des rER eingestreut fanden sich sehr heterogene Mitochondrien sowie eine erhöhte Menge großer Peroxisomen (Abb. 94).

20 µg/L Nonylphenol

Bei den mit 20 µg/L Nonylphenol belasteten Hepatocyten weiblicher Medakas waren nur geringfügige Veränderungen zu den mit 2 µg/L belasteten Tieren zu beobachten. Die Parenchymheterogenität war durch das vermehrte Auftreten von Makrophagen im Leberparenchym erhöht. Die Lipidmenge verringerte sich (Abb. 95). Das rER wies eine verstärkte Fragmentierung sowie vereinzelt dilatierte Zisternen auf. Die rER-Zisternen lagen in Stapeln von bis zu 17 parallelen Zisternen überwiegend in der Zellperipherie (Abb. 96). Die Dictyosomenmenge war leicht erhöht.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 91: Medaka (*Oryzias latipes*) **DMSO-Kontrolle, ♀**; Der Kern verfügt über deutlich mehr Heterochromatin als die Zellkerne der Wasserkontrolle. Die Anzahl der Peroxisomen ist ebenso wie die Menge des rER leicht erhöht. Dagegen weist der Golgi-Apparat eine geringere Aktivität als bei den Wasserkontrollen auf. 9.500 x

Abb. 92: Medaka (*Oryzias latipes*) **2 µg/L Nonylphenol, ♀**; Die Hepatocyten weiblicher Medakas zeigen eine etwas regelmäßige Anordnung des rER. Der normalerweise den Kern umgebende Ring aus rER ist dagegen mit maximal 3 - 4 parallelen Zisternen nur schwach ausgeprägt. Auffällig ist hier die Organisation des Lipids in Feldern. Die Menge der recht heterogenen Mitochondrien ist verringert. 8.300 x

Abb. 93: Medaka (*Oryzias latipes*) **2 µg/L Nonylphenol, ♂**; Der zumeist in die Peripherie verlagerte Zellkern weist deutlich mehr Heterochromatin auf. Im perinukleären Cytoplasma läßt sich als auffälligste Veränderung eine Zunahme fragmentierter und dilatierter Zisternen des rER beobachten. 11.000 x

Abb. 94: Medaka (*Oryzias latipes*) **2 µg/L Nonylphenol, ♂**; Zwischen die Zisternen des rER eingestreut finden sich sehr heterogene Mitochondrien sowie eine erhöhte Menge großer Peroxisomen Die Cristae der Mitochondrien sind sehr kurz und wirken dilatiert. 18.000 x

Bei der Untersuchung der Hepatocyten der männlichen Medakas, die gegenüber 20 µg/L Nonylphenol exponiert wurden, fiel zunächst eine leichte Zunahme von Mitochondrien und Peroxisomen auf (Abb. 97). Auch die bei einer Belastung mit 2 µg/L Nonylphenol auftretenden erweiterten Cristae in den Mitochondrien sowie deren hohe Heterogenität war bei dieser Schadstoffkonzentration wiederzufinden. Das rER erschien im Vergleich zur Wasserkontrolle vermehrt und wies eine stärkere Fragmentierung auf (Abb. 98). Die Glykogenmenge war vergleichbar mit der in den mit 2 µg/L Nonylphenol belasteten Hepatocyten männlicher Medakas.

50 µg/L Nonylphenol

Die erhöhte Parenchymheterogenität bei den Hepatocyten weiblicher Medakas, die mit 50 µg/L Nonylphenol belastet wurden, war vor allem auf das verstärkte Auftreten von Fremdzellen im Leberparenchym zurückzuführen. Im Gegensatz zu den Hepatocyten der Medakas in den übrigen Versuchsgruppen waren in dieser Gruppe nur wenige, relativ homogene Mitochondrien zu beobachten. Intramitochondriale Granula fehlten. Die stärksten Veränderungen fanden sich jedoch im Bereich des Lipoproteinsyntheseapparats: Das umfangreiche rER war in Stapeln von bis zu 27 parallelen Zisternen über den gesamten Zellquerschnitt verteilt (Abb. 99). Eine Unterscheidung von kernnahem und peripherem rER war kaum möglich. Die Speicherareale beschränkten sich auf wenige kleine Bereiche. Die Menge der Dictyosomen war nur leicht erhöht, jedoch wiesen die Golgi-Apparate häufig wenige, auffallend dunkle Zisternen auf, die oftmals von einer Vielzahl charakteristisch gefärbter Vesikel („dunkler Halbmond“ mit hellem Rest) umgeben waren (Abb. 100).

Gegenüberliegende Seite

Abb. 95: Medaka (*Oryzias latipes*) **20 µg/L Nonylphenol, ♀**; Die Lipidmenge erscheint verringert. Das Heterochromatin ist deutlich vermehrt. Das rER weist eine verstärkte Fragmentierung sowie einzeln dilatierte Zisternen auf. Die Dictyosomenmenge ist leicht erhöht. 11.000

Abb. 96: Medaka (*Oryzias latipes*) **20 µg/L Nonylphenol, ♀**; Die Menge des rER ist deutlich erhöht. Die rER-Zisternen liegen in Stapeln von bis zu 17 parallelen Zisternen überwiegend in der Zellperipherie. Die Interzellularen sind etwas erweitert. 10.300 x

Abb. 97: Medaka (*Oryzias latipes*) **20 µg/L Nonylphenol, ♂**; Nach Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol zeigt sich eine leichte Zunahme der Menge an Glykogen, Mitochondrien und Peroxisomen. Deutlich können dilatierte Bereiche des rER erkannt werden. 5.000 x

Abb. 98: Medaka (*Oryzias latipes*) **20 µg/L Nonylphenol, ♂**; Die bereits bei geringeren Konzentrationen von Nonylphenol auftretenden erweiterten Cristae in den Mitochondrien sowie deren hohe Heterogenität ist auch nach Belastung mit 20 µg/L Nonylphenol wiederzufinden. Das rER ist sehr inhomogen und in vielen Hepatocyten stark fragmentiert. 10.000 x

Die Parenchymheterogenität der Hepatocyten männlicher Medakas war nach Belastung mit 50 µg/L Nonylphenol aufgrund stark erweiterter Interzellularen sowie eines erhöhten Auftretens von Makrophagen hoch (Abb. 101). Schon bei geringer Vergrößerung fielen die großen Glykogenfelder auf, welche fast die gesamte Zellperipherie einnahmen. Das Cytoplasma reduzierte sich im wesentlichen auf einen schmalen Ring um den Zellkern und enthielt nur eine geringe Menge von auffällig fragmentierten, leicht dilatierten und wenig regelmäßig angeordneten rER-Zisternen (Abb. 102). Die zahlreichen Mitochondrien zeigten sowohl hinsichtlich ihrer Form als auch der Dilatation der Cristae eine sehr große morphologische Heterogenität.

Positivkontrolle (100 ng/L 17β-Estradiol)

Bei der Positivkontrolle fanden sich bei beiden Geschlechtern sowohl Veränderungen, die als Steigerung der durch Nonylphenol induzierten Effekte gewertet werden konnten (z. B. weiter erhöhte rER-Menge, Zunahme der Aktivität des Golgi-Apparates, Abnahme der Lipidmenge bei den Männchen), als auch Effekte, welche für die Positivkontrolle spezifisch waren.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 99: Medaka (*Oryzias latipes*) 50 µg/L Nonylphenol, ♀; Die Menge der Dictyosomen ist nur leicht erhöht, jedoch weisen die Golgi-Apparate häufig wenige, auffallend dunkle Zisternen auf, die oft von einer Vielzahl charakteristisch gefärbter Vesikel („dunkler Halbmond“, mit hellem Rest) umgeben sind. 23.000 x

Abb. 100: Medaka (*Oryzias latipes*) 50 µg/L Nonylphenol, ♀; Das rER ist mit Stapeln von bis zu 27 parallelen Zisternen über den gesamten Zellquerschnitt verteilt. Kernnahes und peripheres rER läßt sich kaum unterscheiden. Die Speicherareale bleiben auf wenige kleine Bereiche beschränkt. 11.000 x

Abb. 101: Medaka (*Oryzias latipes*) 50 µg/L Nonylphenol, ♂; Die Parenchymheterogenität der Hepatocyten männlicher Fische erscheint nach Belastung mit 50 µg/L Nonylphenol aufgrund stark erweiterter Interzellularen sowie der Immigration von Makrophagen recht hoch. Auffällig sind schon bei geringer Vergrößerung die großen Glykogenfelder, welche fast die gesamte Zellperipherie einnehmen. Das Cytoplasma beschränkt sich im wesentlichen auf einen schmalen Ring um den Zellkern. 4.000 x

Abb. 102: Medaka (*Oryzias latipes*) 50 µg/L Nonylphenol, ♂; Nach Belastung mit 50 µg/L Nonylphenol besteht das rER aus einer nur geringen Anzahl auffällig fragmentierter und leicht dilatierter Zisternen, welche recht unregelmäßig angeordnet sind. Die zahlreichen Mitochondrien zeigen eine ausgeprägte Heterogenität. 11.000 x

Bei den Hepatocyten weiblicher Medakas, die gegenüber 100 ng/L 17 β -Estradiol exponiert wurden, ließ sich wie auch bei den mit 50 μ g/L Nonylphenol belasteten Tieren eine sehr regelmäßige Organisation des rER in Stapel von bis zu 23 Zisternen über den gesamten Zellquerschnitt beobachten. Damit war die rER-Menge nach Belastung mit 17 β -Estradiol insgesamt geringer als in der höchsten Nonylphenol-Konzentration. Außerdem wiesen die rER-Zisternen häufig eine leichte Dilatation und einen stärker erhöhten Fragmentierungsgrad auf als nach Belastung mit 50 μ g/L Nonylphenol. Ebenfalls auffällig war der Rückgang der Lipidspeicher, welcher mit einer drastischen Vermehrung der Myelinwirbel in den Hepatocyten und der myelinartigen Strukturen in den Gallencanaliculi einher ging (Abb. 103). Die Dictyosomen zeigten bis auf eine stärkere Fragmentierung einzelner Zisternen eine mit den weiblichen Hepatocyten der höchsten Nonylphenol-Konzentration vergleichbare Morphologie und Aktivität. Bei den Hepatocyten männlicher Medakas fand sich infolge einer bei einzelnen Individuen sehr stark erhöhten Bildung von Interzellularen ebenfalls eine Erhöhung der Parenchymheterogenität.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 103: Medaka (*Oryzias latipes*) **100 ng/L 17 β -Estradiol, ♀**; Nach Belastung mit 100 ng/L 17 β -Estradiol verteilt sich bei weiblichen Medakas das rER in Stapeln von bis zu 23 parallelen Zisternen über den gesamten Zellquerschnitt. Außerdem weisen die rER-Zisternen häufig eine leichte Dilatation und einen erhöhten Fragmentierungsgrad auf. Ebenso fällt eine Abnahme der Lipidspeicher auf, die mit einer drastischen Zunahme der Myelinwirbel im Gewebe und der myelinartigen Strukturen im Bereich der Gallencanaliculi einhergeht. 9.500 x

Abb. 104: Medaka (*Oryzias latipes*) **100 ng/L 17 β -Estradiol, ♂**; Auch in der Positivkontrolle treten bei den männlichen Medakas stark deformierte Mitochondrien mit erweiterten und fragmentierten Cristae auf, die zudem häufig mit Lipidtropfen assoziiert sind. 18.000 x

Abb. 105: Medaka (*Oryzias latipes*) **100 ng/L 17 β -Estradiol, ♂**; Das rER liegt in Stapeln von bis zu 12 parallelen Zisternen meist in der Peripherie der Zellen. Häufig ist eine ausgeprägte Fragmentierung der rER-Zisternen zu beobachten. Dictyosomen lassen sich selten eindeutig ansprechen und zeigen meist nur geringe Aktivität. Ferner ist eine hohe Anzahl lysosomaler Elemente (Lys) zu verzeichnen, wobei es sich meist um sekundäre und tertiäre Lysosomen, aber auch um große Vakuolen handelt. 8.300 x

Abb. 106: Medaka (*Oryzias latipes*) **100 ng/L 17 β -Estradiol, ♂**; Bei den Hepatocyten männlicher Medakas, die mit 100 ng/L Nonylphenol belastet worden waren, tritt aufgrund einer verstärkten Bildung von Interzellularen eine Zunahme der Parenchymheterogenität auf. Lipid ist als Speicherstoff bei den männlichen Hepatocyten kaum zu beobachten, dagegen sind die Zellen geprägt von ein bis zwei größeren, peripher gelegenen Glykogenfeldern. 5.000 x

Die wenigen, sehr heterogenen Mitochondrien zeigten ebenfalls erweiterte Cristae (Abb. 105). Intra-mitochondriale Granula fehlten völlig. Das rER lag in Stapeln von bis zu 12 parallelen Zisternen meist in der Peripherie der Zellen. Die um den Zellkern liegenden rER-Zisternen waren bei weitem nicht so mächtig ausgebildet wie in den Lebern der gegenüber 50 µg/L Nonylphenol exponierten männlichen Fische (Abb. 106). Häufig konnte auch eine Fragmentierung der rER-Zisternen beobachtet werden. Dictyosomen waren selten eindeutig anzusprechen; sie zeigten meist nur geringe Aktivität. Ein weiterer Unterschied zu den Wasserkontrollen stellte die bisweilen sehr hohe Anzahl sekundärer und tertiärer Lysosomen sowie großer Vakuolen dar (Abb. 106). Nach Belastung mit 17β-Estradiol war Lipid als Speicherstoff in den Hepatocyten männlicher Medakas kaum zu beobachten, dagegen wiesen die Zellen der Weibchen ein bis zwei größere peripher gelegene Glykogenspeicher auf.

5.3 Diskussion

Im Zuge einer kontinuierlichen Belastung von zwei aufeinanderfolgenden Generationen des Medakas (*Oryzias latipes*) mit verschiedenen Konzentrationen von Nonylphenol bzw. 100 ng/L 17β-Estradiol (Positivkontrolle) konnte eine beträchtliche Anzahl konzentrationsabhängiger populationsrelevanter endokriner Effekte beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 50 bzw. 20 µg/L Nonylphenol nahm die Mortalität sowohl der F₁-Generation als auch der F₂-Generation zu, der Schlupf der F₁-Generation verzögerte sich, die Befruchtungsrate in der F₂-Generation war leicht reduziert, und die maximale Gelegegröße verringerte sich in der F₁-Generation ebenso wie in der F₂-Generation ab einer Konzentration von 2 µg/L Nonylphenol. Bezüglich des Wachstums der Medakas konnte dagegen kein Effekt von Nonylphenol nachgewiesen werden.

Auffallend war das Phänomen, dass die Befruchtungsrate in F₃-Generation gegenüber der F₂-Generation weiter erniedrigt war. Das bedeutet, daß der Befruchtungserfolg unter dem Einfluß von Nonylphenol von Generation zu Generation schlechter wird - es scheint ein generationsübergreifender Effekt vorzuliegen. Auch bei anderen Parametern wie etwa der Mortalität vor und nach dem Schlüpfen konnte eine ähnliche Tendenz nachgewiesen werden. Offensichtlich ist der physiologische Zustand der jeweiligen Elterntiere von großer Bedeutung für den Erfolg der nachfolgenden Generation.

Über die Mechanismen endokriner Störungen sowie Modulationen der Geschlechtsreife ist bisher wenig bekannt (Metcalf et al. 2000). Die Ursachen für den starken Rückgang der Befruchtungsrate bei höheren Konzentrationen (≥ 20 µg/L) können ganz unterschiedlicher Natur sein. So kann eine Belastung mit pseudoöstrogenen Substanzen zu einem allgemeinen Rückgang von Fitness und Aktivität (Gray et al. 1997, Hirshfeld et al. 1980), einer Beeinflussung der hormonellen Homöostasis (Christiansen et al. 2000, Kinneberg et al. 2000, Nimrod & Benson 1996), einem veränderten Sexualverhalten (Gray et al. 1999a), einer gestörten Entwicklung der Geschlechtsorgane (Gray et al. 1997, Gronen et al. 1999, Jobling et al. 1996) und damit zu einer verminderten Fruchtbarkeit oder auch direkt zu einer reduzierten Befruchtung führen (Giméno et al. 1997).

Es wird generell angenommen, dass die Veränderungen in der Gonadenentwicklung durch Xenoöstrogene bereits *in ovo* oder *in utero* beginnen, also während des Zeitraums der Differenzierung dieser Gewebe in den männlichen oder weiblichen Phänotyp (Gullette et al. 1994). Der generationsübergrei-

fenden Rückgang der Befruchtungsrate könnte das Ergebnis einer Exposition in kritischer Entwicklungsstadien sein, welche zur Modifikation der Organisation des Reproduktions- und endokrinen Systems führt, was in vermindertem Reproduktionserfolg zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife resultieren kann (Guliette et al. 1996). Dabei scheint die Akkumulation der Xenööstrogene durch einen maternalen Transfer von besonderer Bedeutung zu sein, liefert sie doch eine mögliche Erklärung für den stetigen Rückgang des Befruchtungserfolges von einer Generation zur nächsten. Eine wichtige Veränderung stellt in diesem Zusammenhang die Zunahme der Sensitivität auf Belastung mit Nonylphenol von einer Generation zur nächsten dar, welche sich vor allem in einem Rückgang der Befruchtungsrate in der F₃-Generation schon bei einer Belastung mit 2 µg/L Nonylphenol (im Gegensatz zu 20 µg/L Nonylphenol in der F₂-Generation) manifestierte.

In der Regel war eine klare positive Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Effekte durch Nonylphenol zu erkennen. Die Reaktion auf 50 µg/L Nonylphenol lag für die meisten Parameter in einem ähnlichen Bereich wie in der Positivkontrolle (100 ng/L 17β-Estradiol). Die hohe Sterblichkeit bei der mit 50 µg/L Nonylphenol belasteten Gruppe und der Positivkontrolle während der Anzucht sind wohl eher unspezifischen Faktoren als einer verstärkten schadstoffinduzierten Sauerstoffzehrung zuzuschreiben. Es handelt sich sicher nicht um endokrine Effekte, da Nonylphenol eine um den Faktor 1000 schwächere östrogene Wirkung hat als 17β-Estradiol (Jobling et al. 1996) und in beiden Konzentrationen nur geringfügige Effekte auftraten. In diesem Zusammenhang sollte daran erinnert werden, dass bei einer Exposition einer weiteren Versuchsgruppe von Medakas gegenüber 100 ng/L Nonylphenol nicht eine einzige Larve überlebte. Gegen eine stark toxische Wirkung spricht, dass in der Embryonalentwicklung der Medakas nur leichte Entwicklungsverzögerungen beobachtet werden konnten, welche nicht direkt auf eine toxische Wirkung hinweisen. Dabei konnte bereits in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Belastung mit Nonylphenol sich negativ auf das Überleben der Larven und den Schlüpfertag auswirkt (Gray & Metcalfe 1997, Nimrod & Benson 1998, Shioda & Wakabayashi 2000). Demgegenüber sind toxische Effekte von Nonylphenol auf frühe Lebensstadien von Teleosteen noch weitgehend unerforscht.

Das verfrühte Schlüpfen 17β-Estradiol-exponierter Larven konnte bereits in einer anderen Untersuchung beobachtet werden (Iwamatsu 1999). Eine mögliche Erklärung für das ungewöhnlich frühe Schlüpfen der mit 17β-Estradiol belasteten Medakalarven könnte die verstärkte Spontanbewegung der Embryonen in der Eihülle sein, die allerdings nur in einzelnen Fällen tatsächlich unter dem Mikroskop beobachtet wurde. Für diese These spricht, dass der Dottersack der Larven zum Zeitpunkt des Schlüpfens noch verhältnismäßig groß war, d. h., ein Aufbrauchen der Dotterreserven kann nicht für das frühe Schlüpfen verantwortlich gemacht werden. Andererseits kann auch ein verstärkter Sauerstoffverbrauch infolge einer unspezifischen Stresswirkung zu einem verfrühten Schlüpfen geführt haben.

Während die F₁-Generation lebenslang konstanten Schadstoffkonzentrationen ausgesetzt war, fand bei den Tieren der F₂-Generation nur bis etwa zum 14. Tag nach dem Schlüpfen ein täglicher Wechsel der Schadstofflösungen statt. Bei der anschließenden statischen Belastung kann man bei einem 14tägigen Wasserwechsel in der F₂-Generation nach dem Umsetzen in die Aquarien bestenfalls von einer „Pulsbelastung“ ausgehen, da in verschiedenen Untersuchungen anhand einer Analyse der statischen Bedingungen ein deutlicher Rückgang der Realkonzentration Nonylphenol innerhalb recht kurzer Zeiträume nachgewiesen werden konnte (Gray & Metcalfe 1997, Kinneberg et al. 2000). Dabei kommen

für einen Verlust des Schadstoffs im Aquarium eine Aufnahme durch die Fische, eine Adsorption an die Glaswände, Biodegradationsvorgänge (Ekelund et al. 1993) und Photodegradation (Ahel et al. 1994) in Frage. So konnte gezeigt werden, dass durch Sonnenlicht täglich bis zu 30 % des Nonylphenols an der Oberfläche von Seen abgebaut wird (Ahel et al. 1994). Außerdem wird durch die Gegenwart organischer Substanzen, wie es in einem Aquarium bei zweiwöchigem Wasserwechsel zu erwarten ist, die Abbaugeschwindigkeit nochmals erhöht.

Die Bio- und Photodegradation von Nonylphenol kann eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Geschlechterverhältnis in der F₁- und F₂-Generation liefern. Während in der F₁-Generation eine signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnisses und das Auftreten von Zwittergonaden zu beobachten war, zeigte die F₂-Generation nur noch eine geringe Verschiebung sowie das Fehlen von Zwittergonaden. Okada et al. (1964) wiesen darauf hin, dass sich Zwittergonaden nach dem Ende einer endokrinen Belastung im Zuge der Normalisierung des endogenen Testosteronlevels wieder zurückbilden können. Das Fehlen von Zwittergonaden in der F₂-Generation ist daher möglicherweise auf die zu kurze Belastung mit Nonylphenol bzw. 17 β -Estradiol zurückzuführen. Auch der gegenüber der F₁-Generation verringerte Weibchenanteil könnte auf die vergleichsweise kurze Belastung bis zum 14. Tag nach dem Schlüpfen zurückzuführen sein, die bei vielen Individuen nicht ausreichte, um eine vollständige Geschlechtsumkehr zu bewirken.

Anhand der ultrastrukturellen Untersuchungen der Leber der F₁-Generation konnte gezeigt werden, dass bereits ab einer Konzentration von 2 μ g/L Nonylphenol charakteristische Veränderungen der Hepatocyten beobachtet werden können. Diese äußern sich vor allem in einem dosisabhängigen Anstieg der Menge des rER sowie der Aktivität der Dictyosomen. Diese beiden Parameter weisen auf eine verstärkte (Lipo-) Proteinbiosynthese hin, die offensichtlich charakteristisch ist für eine (pseudo-)östrogene Belastung. Das wichtigste Syntheseprodukt der Hepatocyten dürfte Vitellogenin sein. Dieser Befund deckt sich auch mit den Ergebnissen der Untersuchungen an Regenbogenforellen und Karpfen, in denen gezeigt werden konnte, dass auch schon Konzentrationen von 1 μ g/L Nonylphenol sowohl einen Effekt auf den Vitellogeningehalt im Blutplasma der Fische als auch eine Wirkung auf die Ultrastruktur der Leber ausüben kann. In der vorliegenden Untersuchungen konnte die endokrine Wirkung auch als signifikanter Anstieg des Vitellogenin-mRNA-Gehalts in der Leber männlicher Medakas ab einer Konzentration \geq 20 μ g/L Nonylphenol nachgewiesen werden.

Die Veränderungen der hier untersuchten Endpunkte Reproduktionserfolg, Geschlechterverhältnis und Mortalität sind zweifellos als populationsbiologisch und ökologisch relevante Parameter anzusehen (Braunbeck et al. 1990, Schwaiger & Negele 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind dabei von besonderer Bedeutung, da hier erstmalig 2 Generationen einer Fischart unter Belastung gehalten wurden, und somit gezeigt werden konnte, dass bei Parametern wie Mortalität und Reproduktionserfolg generationsübergreifende Effekte auftreten können.

6. Untersuchungen zur Wirkung von Octylphenol auf die Entwicklung und Reproduktion des Medakas (*Oryzias latipes*) im Life Cycle-Experiment

Zusammenfassung: Medakas wurden ab 2 h nach der Befruchtung bis zur Geschlechtsreife mit 2, 20 und 50 µg/L Octylphenol belastet. Zusätzlich wurden Medakas gegenüber einer Lösungsmittelkontrolle (0,01 % DMSO) und einer Positivkontrolle mit 100 ng/L 17β-Estradiol exponiert. Die Exposition resultierte in einer um 30 % erhöhten Larvmortalität sowie einer um 20-30 % erhöhten Mortalität vom Zeitpunkt des Schlüpfens bis zur Geschlechtsreife.

Bei einer Belastung mit 50 µg/L Octylphenol sowie in der 100 ng/L 17β-Estradiol konnte ein signifikant verringertes Wachstum beobachtet werden. Das Geschlechterverhältnis verschob sich von 42:58 Weibchen/Männchen in der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle nach 57:40 bei einer Belastung mit 50 µg/L Octylphenol und 61:34 in der Positivkontrolle. Außerdem zeigten 3 bzw. 4 % der Fische in der mit 50 µg/L Octylphenol belasteten Versuchsgruppe und der Positivkontrolle Mischgonaden. Geschlechtsspezifische Veränderungen durch Octylphenol wurden in einem Kreuzungsexperiment untersucht, in dem jeweils belastete Medakas eines Geschlechts mit unbelasteten Individuen des anderen Geschlechts verpaart wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Befruchtungsrate bei den belasteten Männchen leicht verringert, bei den belasteten Weibchen dagegen um durchschnittlich 11 % höher war als in der Kontrollgruppe. Andererseits zeigten die Nachkommen von belasteten Weibchen und unbelasteten Männchen eine erhöhte Larvmortalität. Anhand der Untersuchung der Leberultrastruktur konnten deutliche Veränderungen als adaptive Anpassung an eine Belastung mit Octylphenol beobachtet werden. Dabei handelte es sich im wesentlichen um eine dosisabhängige Proliferation von rauhem endoplasmatischem Reticulum (rER) und Golgi-Apparat, verbunden mit einer besonders bei den Männchen ausgeprägten Fragmentierung und Dilatation der rER-Zisternen sowie einer Aktivitätszunahme der Dictyosomen. Während bei den Weibchen eine Mengenzunahme der Dictyosomen schon ab einer Konzentration ≥ 20 µg/L Octylphenol zu beobachten war, konnte sie bei den Männchen nur bei einer Exposition gegenüber 50 µg/L Octylphenol nachgewiesen werden.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine Belastung mit Octylphenol beim Medaka im Life Cycle-Experiment eine Reihe deutlicher Veränderungen hervorruft, welche mit der starken östrogenen Potenz dieser Substanz korreliert werden können.

6.1 Einleitung

Octylphenol ist neben Nonylphenol ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der Alkylphenole. Obwohl der Verbrauch von 72.000 t/a weltweit deutlich niedriger als bei Nonylphenol liegt, sind Octylphenol und Nonylphenol zusammen jene Vertreter der Alkylphenole, die am häufigsten in der aquatischen Umwelt anzutreffen sind. (Jobling et al. 1996). Obwohl die Konzentration von Octylphenol in Flüssen und Seen selten 1 µg/L übersteigt (Blackburn & Waldock 1995), konnten in Sedimentproben der Nordamerikanischen Seen auch schon bis zu 23,7 µg/L Octylphenol gemessen werden (Bennett et al. 1998, Bennie et al. 1997). Dabei konnte in einigen Untersuchungen gezeigt werden, dass Octylphenol eine höhere endokrine Potenz besitzt als Nonylphenol (White et al. 1994, Nair-Menon et al. 1996).

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von Octylphenol durchgeführt. Die Resultate dieser Untersuchungen zeigen, dass Octylphenol zahlreiche reproduktionsrelevante Effekte verursachen kann, wie Störungen des Östrus (Blake & Ashiru 1997) und Stimulation des Prolactin-Gens bei Ratten (Abraham & Frawly 1997). Darüber hinaus bewirkt Octylphenol einen Anstieg des Vitellongenin-Plasma-Levels bei Medaka (*Oryzias latipes*; Gronen et al. 1999) und Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*; Sherry et al. 1999). Die genannten Studien lassen keine Aussage über eine chronische Wirkung von Octylphenol zu. Um solche Effekte zu erfassen, müssen Langzeitversuche, wie die von Gray et al. (1999a, b) vorgestellten Untersuchungen an Medakas durchgeführt werden. Gray et al. (1999 a, b) konnten nach 12 wöchiger Octylphenolexposition Veränderungen des Reproduktionserfolgs sowie Verhaltensänderungen nachweisen. Weiterhin konnten sie die Ausbildung von Zwittergonaden nach histologischer Aufarbeitung der Versuchstiere darstellen.

Das Interesse der vorliegenden Untersuchung konzentrierte sich sowohl auf Überlebens- und Reproduktionserfolg gegenüber Octylphenol exponierter Medakas als auch auf das Geschlechterverhältnis und eine mögliche Manifestation der endokrinen Wirkung von Octylphenol in der Ultrastruktur der Leber. Cytologische Veränderungen in der Leber sollten als zellulärer Biomarker einer endokrinen Belastung dienen. Außerdem wurden bei diesem Life Cycle-Experiment Kreuzungsversuche durchgeführt, um so Aufschluss über die geschlechtsspezifischen Einschränkungen des Reproduktionserfolgs zu gewinnen.

6.2 Wirkung von Octylphenol auf Entwicklung, Reproduktion, Geschlechterverhältnis und Leberultrastruktur des Medakas (*Oryzias latipes*)

6.2.1 Schlüpfertag und Sterblichkeit in der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. Estradiol

Die mit Octylphenol belasteten Versuchsgruppen zeigten in der F₁-Generation eine erhöhte Sterblichkeit vor dem Schlüpfen. Während in der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle bis zu 10 % der Eier zugrunde gingen, waren es bei den octylphenol-exponierten Gruppen 30 %. Dabei war die Mortalität vor dem Schlüpfen bei einer Konzentration von 20 µg/L Octylphenol am höchsten (Abb. 107, Tab. 19). Die mit 100 ng/L 17β-Estradiol belastete Versuchsgruppe zeigte dagegen einen deutlich geringeren Anstieg der Mortalität. Die Mortalität nach dem Schlüpfen korrelierte positiv mit der Octylphenolkonzentration. In der höchsten Konzentration von 50 µg/L konnte eine Zunahme von bis zu 300 % registriert werden. Im Gegensatz dazu starben in der Positivkontrolle keine Fische.

Als Grund für die erhöhte Mortalität konnten im wesentlichen eine Verzögerung bzw. ein Stillstand der Entwicklung (Abb. 116) sowie Probleme mit der Blutzirkulation wie Blutgerinnsel, partieller Stillstand des Blutkreislaufs und gelegentlich auftretende Blutstauungen (Abb. 117) beobachtet werden. Außerdem traten vereinzelt Monophthalmien (Abb. 118), also die Ausbildung nur eines Auges auf. In hohem Maße traten dagegen Wirbelsäulenverkrümmungen (Abb. 119 und 120) auf sowie die Unfähigkeit, sich nach dem Schlüpfen aufzurichten. Die fehlende Aufrichtung ist vermutlich auf eine nicht entfaltete Schwimmblase zurückzuführen ist. Allerdings traten diese Fehlbildungen nicht dosis-

abhängig, sondern in allen mit Octylphenol bzw. 17 β -Estradiol belasteten Gruppen mehr oder weniger häufig auf.

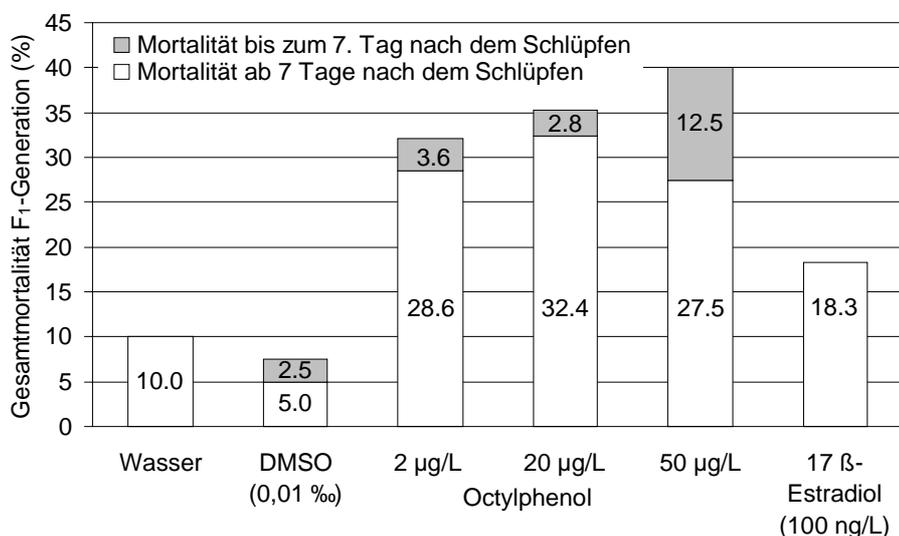


Abb. 107: Mortalität bis zum 7. Tag nach dem Schlüpfen und vom 7. Tag nach dem Schlüpfen bis zum Erreichen der Geschlechtsreife der F₁-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17 β -Estradiol in %.

Nächste Seite

Abb. 108: Medaka (*Oryzias latipes*), 50 µg/L Octylphenol, 143 h: Bei einem Individuum ist ein deutlicher Wachstumsstillstand zu beobachten (Pfeil), während alle anderen Larven etwa das gleiche Entwicklungsstadium aufweisen. 36 x

Abb. 109: Medaka (*Oryzias latipes*), 2 µg/L Octylphenol, 143 h: Blutstauung in Dottersackgefäßen. Diese Larve zeigt eine deutliche Verzögerung der Entwicklung. Sie überlebte die folgenden 24 h nicht. 90 x

Abb. 110: Medaka (*Oryzias latipes*), 20 µg/L Octylphenol, 95 h: Wirbelsäulenverkrümmung bei einer ansonsten normal entwickelten Larve. 100 x

Abb. 111: Medaka (*Oryzias latipes*), 17 β -Estradiol, 239 h: Die Larve zeigt bei einem normalen Entwicklungsstand eine deutlich ausgeprägte Wirbelsäulenverkrümmung. 100 x

Abb. 112: Medaka (*Oryzias latipes*), 20 µg/L Octylphenol, 191 h: Monophthalmie (Ausbildung nur eines Auges). Die Larve ist auch in ihrer sonstigen Entwicklung deutlich zurückgeblieben (vgl. Abb. 116). 90 x

Tab. 19: Veränderungen in der Zusammensetzung der F₁-Generation des Medaka (*Oryzias latipes*) nach kontinuierlicher lebenslanger Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol

		Wasser		DMSO		Octylphenol						100 ng/L 17β-Estradiol	
						2 µg/L		20 µg/L		50 µg/L			
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Petrischalen	Eingesetzte Eizahl	74	100	99	100	115	100	101	100	116	100	103	100
	Unbefruchtete Eier *	14	18,82	19	18,9	31	26,71	30	29,8	36	31	32	31,72
	Befruchtete Eier *	60	81,18	80	81,10	84	73,29	71	70,20	80	69,00	71	68,82
	Mortalität vor dem Schlüpfen **	2	3,33	3	3,75	21	25	10	-	-	14,085	13	18,31
	Frühe Larvalmortalität **	4	6,67	1	1,25	3	3,57	13	18,31	22	27,5	-	-
	Gesamt-Larvalverluste **	6	10	4	5	24	28,57	23	32,39	22	27,5	13	18,31
Aquarien	Eingesetzte Larven	54	90	76	95	60	71,43	48	67,61	58	72,5	58	81,69
	Mortalität ab Schlupf ***	-	-	2	2,5	3	3,57	2	2,82	10	12,5	-	-
	Größe Endpopulation	54	90	74	92,5	57	67,86	46	64,79	48	60	58	81,69
	Gesamt mortalität ****	6	10	6	7,5	27	32,14	25	35,21	32	40	13	18,31

* in Bezug auf die eingesetzte Eizahl; ** in Bezug auf die befruchteten Eier; *** in Bezug auf die in die Aquarien eingesetzten Larven; **** Zahl der eingesetzten Larven - Zahl der adulten Tiere (Endpopulation)

6.2.2 Wachstum der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17 β -Estradiol

Die Tiere aller Versuchsgruppen erreichten die Geschlechtsreife nach 12-13 Wochen. Die Eier einer weiteren, mit 100 $\mu\text{g/L}$ Octylphenol belasteten Versuchsgruppe gingen etwa 72 h nach Beginn der Belastung zugrunde.

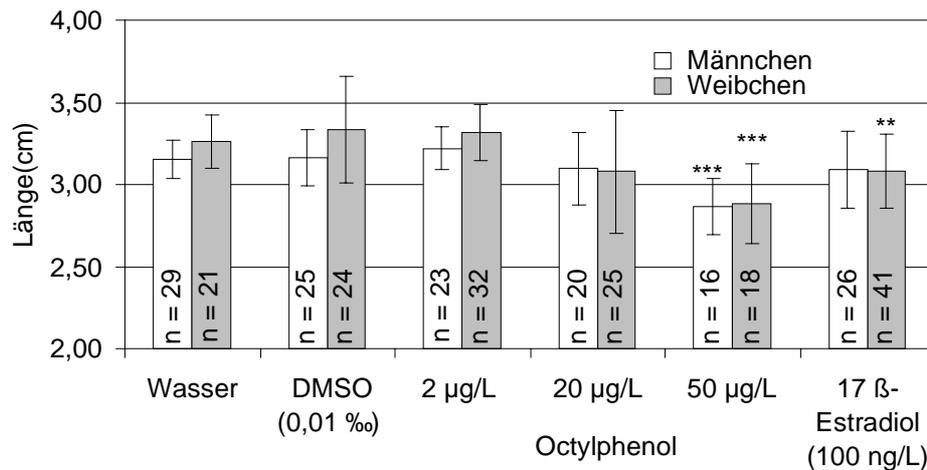


Abb. 113: Längenunterschiede in der F₁-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17 β -Estradiol zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife. Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung aller Individuen der Versuchsgruppen. Abweichungen zu den Kontrollen nach Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Männchen der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle sowie die mit 2 $\mu\text{g/L}$ Octylphenol belasteten Männchen waren signifikant kleiner als die Weibchen (Abb. 113). Ab Konzentrationen $\geq 20 \mu\text{g/L}$ Octylphenol konnten keine Unterschiede mehr zwischen den Geschlechtern beobachtet werden. Außerdem waren Länge und Gewicht aller mit 50 $\mu\text{g/L}$ Octylphenol belasteten Medakas sowie der mit 100 ng/L 17 β -Estradiol belasteten Weibchen gegenüber den Kontrolltieren signifikant verringert (Abb. 113, Abb. 114). Im Gegensatz zur Länge war das Gewicht der Weibchen aller Versuchsgruppen etwa 10 % höher als bei den entsprechenden Männchen.

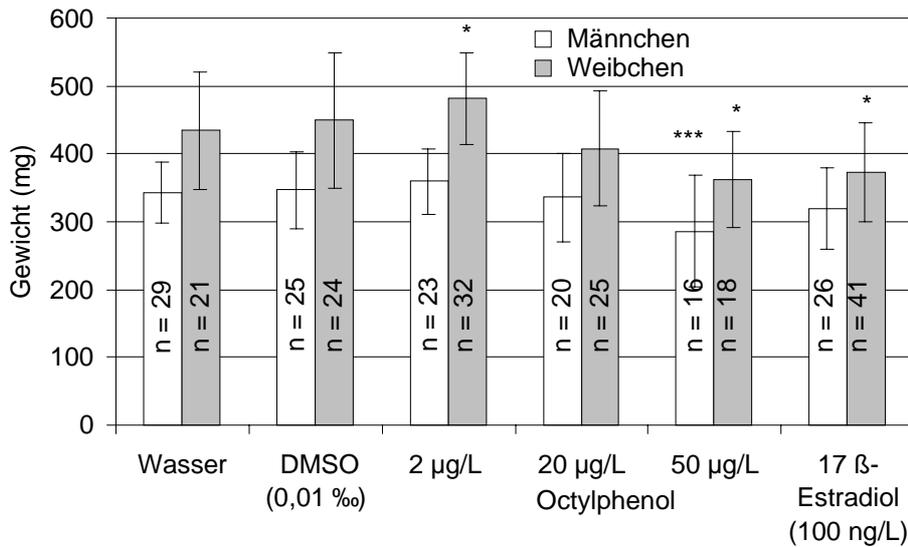


Abb. 114: Gewichtsunterschiede in der F₁-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife. Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aller Individuen der Versuchsgruppen. Abweichungen zu den Kontrollen nach Mann-Whitney U-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

6.2.3 Geschlechterverhältnis der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol

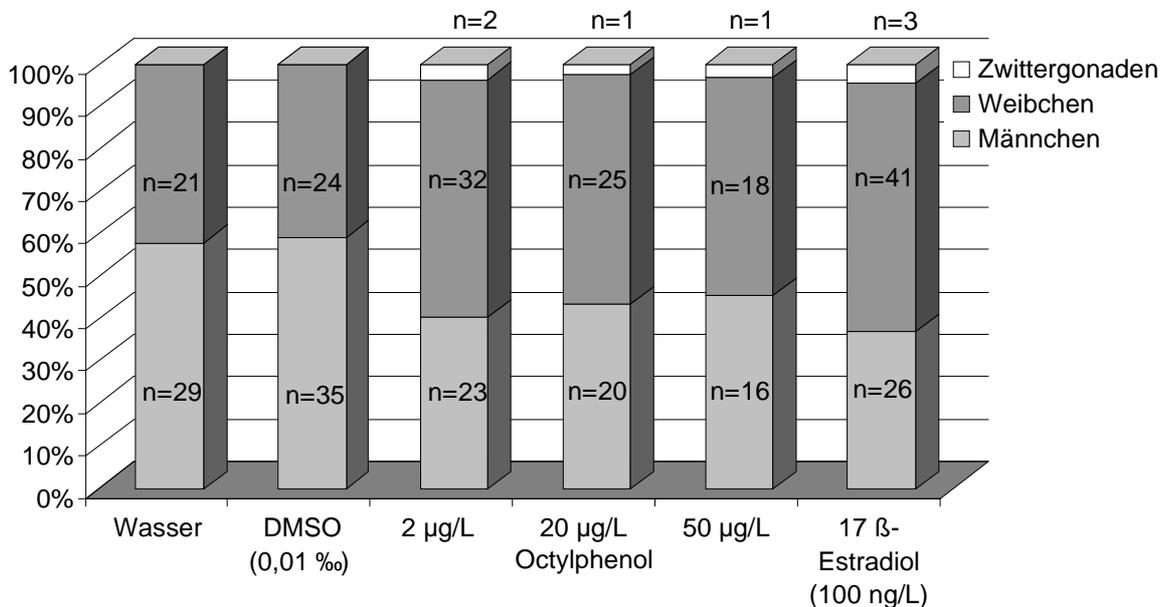


Abb. 115: Geschlechterverhältnis in der F₁-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol.

Die mit Octylphenol belasteten Versuchsgruppen zeigten einen $36 \pm 3,6$ % höheren Anteil an Weibchen als in den Kontrollgruppen. Dabei war die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses jedoch unabhängig von der Octylphenolkonzentration. Zusätzlich zeigten $3,0 \pm 0,4$ % der gegenüber Octylphenol exponierten Individuen Zwittergonaden (Abb. 115). In der Positivkontrolle konnte bei 4,3 % aller Fische die Ausbildung von Eifollikeln im Hoden beobachtet werden. Der hier ermittelte Anteil an Weibchen lag mit 58 % etwas über den für die Belastung mit Octylphenol ermittelten Werten.

6.2.4 Histologische Veränderungen in den Gonaden der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17 β -Estradiol

Neben dem Auftreten von Zwittergonaden konnten bei den belasteten Individuen in Bezug auf die Gonadenhistologie keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies galt insbesondere für die Hoden der Versuchstiere (Abb. 118). Die Zwittergonaden waren charakterisiert durch ein testikuläres Gewebe, in dem eine individuell unterschiedlich große Anzahl von Primärfollikeln zu finden waren. Die Primärfollikel waren von den Spermatogonien durch die sie umgebenden Follikelzellen leicht zu unterscheiden (Abb. 119). Eine Orientierung der Follikel innerhalb der Zwittergonade war nicht festzustellen.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 116: Medaka (*Oryzias latipes*), **DMSO-Kontrolle, Ovar:** Die Follikelreife zeigt eine charakteristische Abstufung. Während in der Peripherie Primärfollikel (P I) zu finden sind, können im Zentrum bereits reife Oocyten (Oc) beobachtet werden. P II = Sekundärfollikel. 40 x

Abb. 117: Medaka (*Oryzias latipes*), **17 β -Estradiol, Ovar:** Deutlich erkennbar ist die ungewöhnlich große Zahl von Primärfollikeln (P I), während nur wenige Sekundärfollikel (P II) und keine Oocyten vorhanden sind. 35 x

Abb. 118: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle, Hoden:** Der Hoden des Medakas zeigt eine mehr oder weniger deutliche Gliederung in peripher gelegene Spermatogonien (Sg) und nach innen folgenden Spermatozyten 1. und 2. Ordnung (Sz I und Sz II). Zentral ist der spermiengefüllte Tubulus seminiferus (Ts) zu sehen. 73 x

Abb. 119: Medaka (*Oryzias latipes*), **17 β -Estradiol, Zwittergonade:** Die Zwittergonaden sind charakterisiert durch ein testikuläres Gewebe, in dem verteilt Primärfollikeln (Pfeile) liegen. Die Primärfollikel sind von den Spermatogonien durch die sie umgebenden Follikelzellen leicht zu unterscheiden. Sg = Spermatogonien, Sz I = Spermatozyten 1. Ordnung, Sz II = Spermatozyten 2. Ordnung. 74 x

Die Ovarien der gegenüber Octylphenol exponierten Weibchen zeigten keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen. Bei den mit 17 β -Estradiol belasteten Weibchen konnten jedoch vergleichsweise häufig Gonaden angetroffen werden, welche im Vergleich zu den Kontrollweibchen (Abb. 116) eine auffällig geringe Anzahl an Sekundärfollikeln und reife Oocyten (Abb. 117) aufwiesen. Auch ausschließlich atretische Follikel enthaltende Ovarien konnten vereinzelt beobachtet werden.

6.2.5 Reproduktionserfolg der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17 β -Estradiol

Die lebenslang mit Octylphenol belasteten Individuen der F₁-Generation zeigten im Reproduktionsversuch einen dosisabhängigen Rückgang der Befruchtungsrate. Während in der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle 81 % der Eier befruchtet wurden, fiel der Wert konzentrationsabhängig von 73 % bei 2 μ g/L Octylphenol auf 69 % nach Belastung mit 50 μ g/L Octylphenol und 100 ng/L 17 β -Estradiol. Dies entspricht einem Rückgang um 10-15 % (Abb. 120).

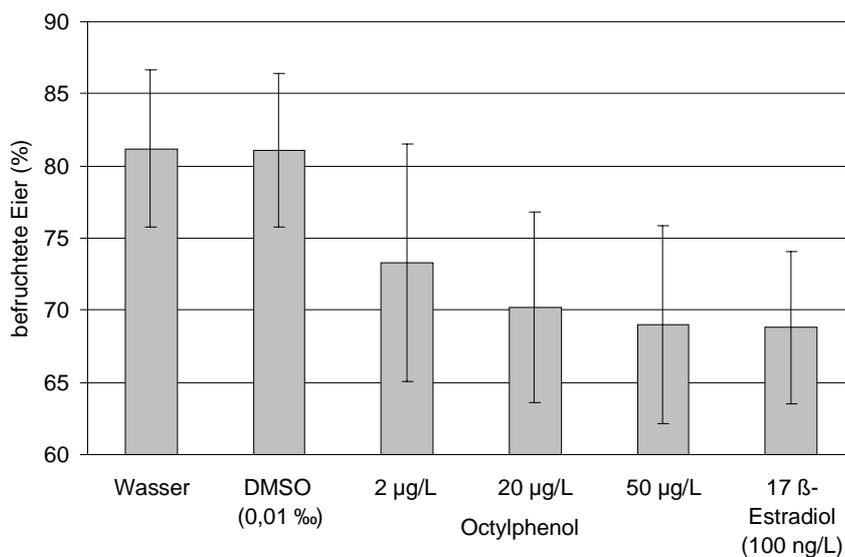


Abb. 120: Befruchtungsrate (%) in der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17 β -Estradiol. Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung von 8 Tagen aus jeweils 12 Weibchen pro Tag.

Im Gegensatz zum Rückgang im Befruchtungserfolg konnte in der durchschnittlichen Eizahl pro Weibchen und Tag sowie in der maximalen Gelegegröße ein leichter, wenn auch nicht signifikanter Anstieg verzeichnet werden. Dieser Trend konnte jedoch nicht bei den Medakas der Positivkontrolle

beobachtet werden, deren durchschnittliche Eizahl etwa 3 % unter der der Kontrollen lag. Auch die maximale Gelegegröße war hier mit 28 Eiern am niedrigsten (Abb. 121).

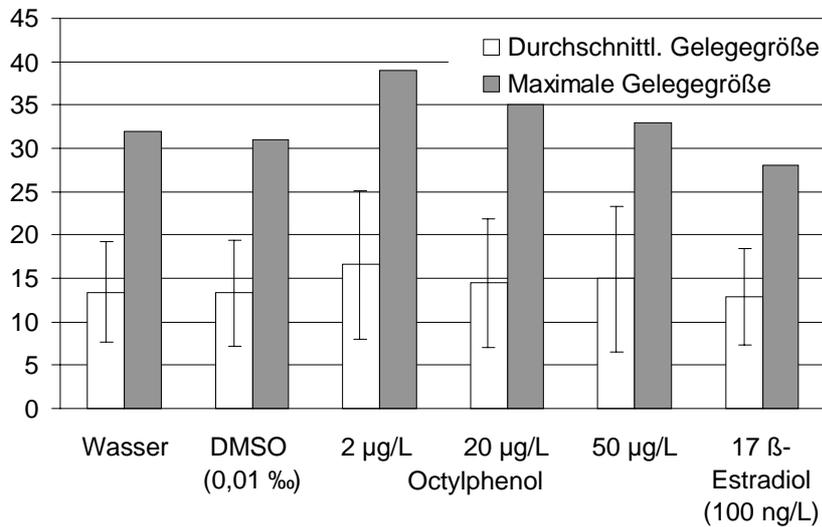


Abb.121: Durchschnittliche und maximale Gelegegröße in der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol. Daten als Maximalwerte bzw. Mittelwerte ± Standardabweichung von 8 Tagen aus jeweils 12 Weibchen pro Tag.

6.2.6 Schlüpfertag und Sterblichkeit der F₂-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol

In der F₂-Generation konnte bezüglich der Mortalität keine klare Tendenz ermittelt werden, da die Sterblichkeit der mit 2 und 50 µg/l Octylphenol belasteten Medakas sowie die der Positivkontrolle vor dem Schlüpfen geringer war als in der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle (Abb. 122).

Andererseits konnten nach dem Schlüpfen nur in den mit Octylphenol- und 17β-Estradiol-belasteten Versuchsgruppen tote und mißgebildete Larven beobachtet werden. Daher war die Gesamtmortalität der mit Octylphenol und 17β-Estradiol belasteten Versuchsgruppen größer als in der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle. Auffällig war die hohe Mortalität vor dem Schlüpfen bei den mit 20 µg/L Octylphenol belasteten Medakas, obwohl keine Verpilzung auftrat.

Die beobachteten Fehlentwicklungen waren mit denen der F₁-Generation vergleichbar. Andererseits setzte die Blutzirkulation bei Konzentrationen $\geq 20 \mu\text{g/L}$ Octylphenol ca. 10 Stunden früher ein als bei den anderen Versuchsgruppen.

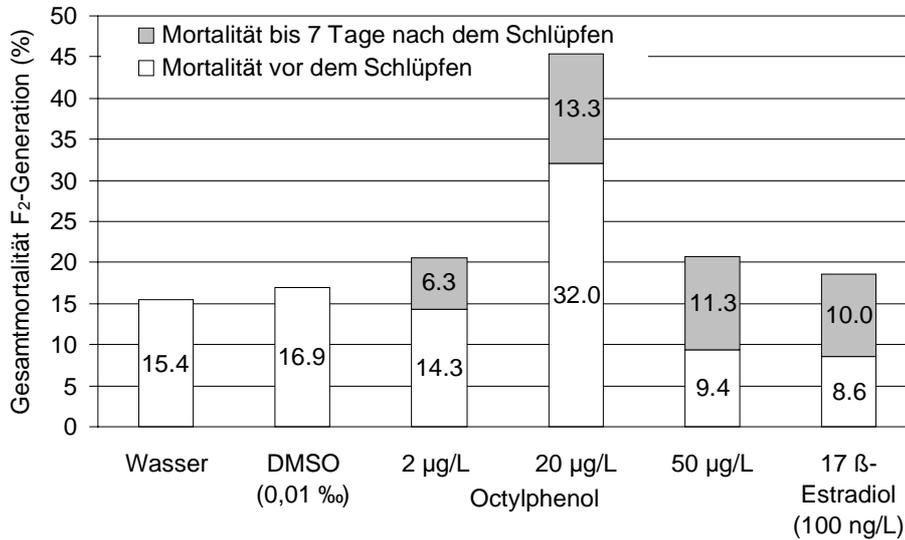


Abb. 122: Mortalität bis zum 7. Tag nach dem Schlüpfen der F₂-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol.

6.2.7 Kreuzungsexperimente in der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*)

Die Befruchtungsrate der gegenüber Octylphenol exponierten Weibchen lag zwischen 7,5 – 15 % höher als bei der DMSO-Kontrolle (Abb. 123). Dabei erzielte die mit 2 µg/L Octylphenol belastete Versuchsgruppe mit 93 % den höchsten Wert. Die mit Octylphenol belasteten Männchen zeigten einen Trend zu einer gegenüber der DMSO-Kontrolle verringerten Befruchtungsrate. Dieser Trend war bei 50 µg/L Octylphenol am stärksten ausgeprägt. Trotz der hohen Standardabweichung unterschieden sich beide Versuchsgruppen der Positivkontrolle (♀ ♀ bzw. ♂ ♂ belastet) signifikant voneinander ($p < 0,001$) und auch von der Lösungsmittelkontrolle ($p = 0,02$).

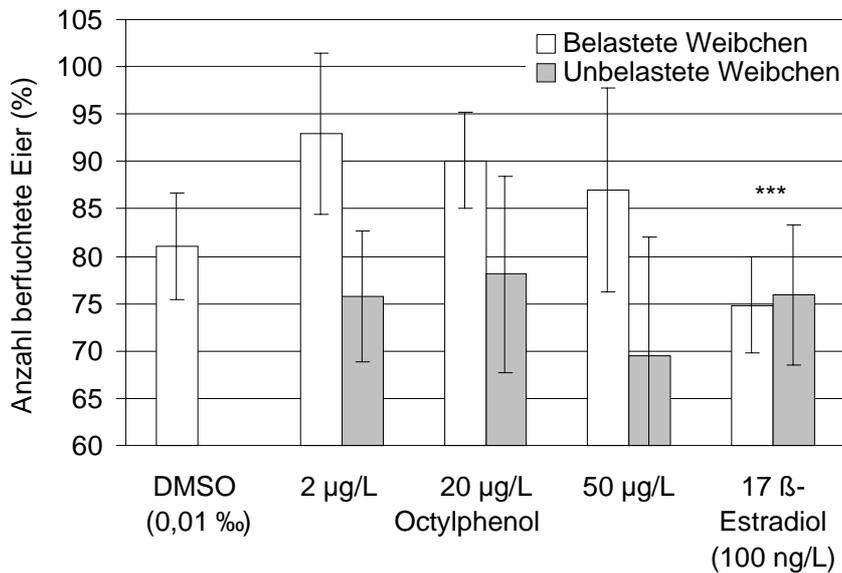


Abb. 123: Befruchtungsraten im Kreuzungsexperiment in der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol bzw. 17β-Estradiol. Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung von 2 x 10 belasteten bzw. unbelasteten Weibchen und 2 x 5 Männchen. Abweichungen zu den Kontrollen nach Mann-Whitney U-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

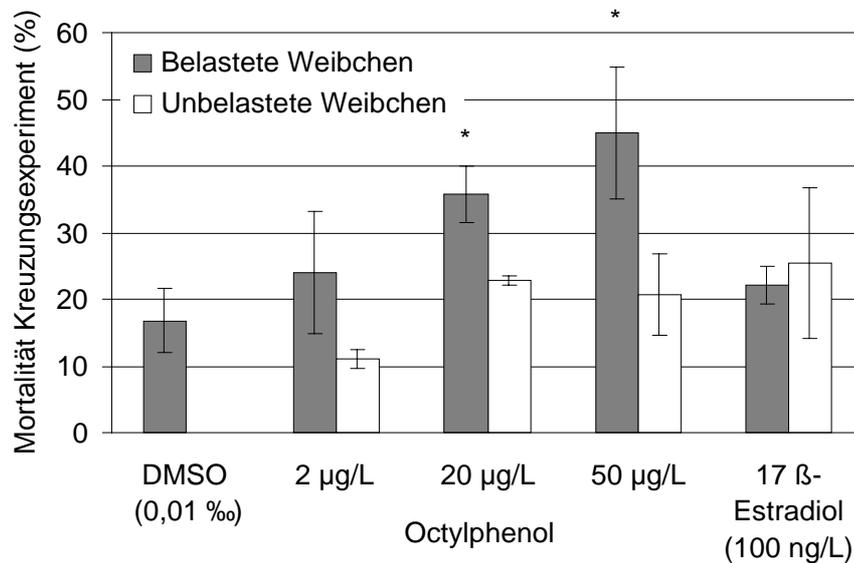


Abb. 124: Mortalität der Nachkommen im Kreuzungsversuch mit dem Medaka (*Oryzias latipes*). Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung von 2 Replika der Versuchsgruppen. Signifikanzberechnung der Unterschiede zur Kontrolle nach Mann-Whitney U-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Die Larvalmortalität der exponierten Weibchen von der Befruchtung bis etwa 1 Woche nach dem Schlüpfen zeigte einen dosisabhängigen und ab $\geq 20 \mu\text{g/L}$ Octylphenol auch einen signifikanten Anstieg (Abb. 124). Dies ist von besonderer Bedeutung, da bei den Nachkommen nicht exponierter Weibchen und belasteter Männchen nur bei $50 \mu\text{g/L}$ ein signifikanter Anstieg der Mortalität auftrat. Bei den Nachkommen der Positivkontrolle war weder ein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen, noch im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu beobachten.

6.2.8 Nachweis der Vitellogenin-mRNA-Induktion in der Leber des Medakas nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol

Da die Lebern für die mRNA-Messungen bei der Probenahme gepoolt worden waren und die makroskopische Geschlechtsbestimmung sich als sehr ungenau erwies, konnte bei der Messung der Vitellogenin-mRNA in der Leber der Versuchsfische keine Unterschiede festgestellt werden, da sich offensichtlich in den Probebehältern für die Lebern männlicher Tiere auch Lebern von Weibchen befanden.

6.2.9 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber des Medakas nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit Octylphenol

Die Befunde der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber der männlichen bzw. weiblichen Medakas (*Oryzias latipes*) sind in den Tabellen 21 und 22 aufgelistet und semiquantitativ bewertet.

Wasserkontrollen

Das Leberparenchym der Medakaweibchen erschien sehr homogen. Die Hepatocyten lagen mehr oder weniger dicht beieinander. Erweiterte Interzellularen sowie Makrophagen waren selten. Die Hepatocyten zeigten eine ausgeprägte Gliederung in ausgedehnte Cytoplasma- und verhältnismäßig kleine Speicherareale (Abb. 125). Die Glykogenspeicher waren kompakt und meistens mit Lipidtropfen durchsetzt. Die Lipidmenge selbst war relativ hoch. Die leicht peripher verlagerten Zellkerne hatten einen gleichmäßigen Umriss und verfügte über nur wenig Heterochromatin, welches im Wesentlichen in der Kernperipherie und um den Nucleolus zu beobachten war. Der Nucleolus der Hepatocyten war verhältnismäßig klein: Er nahm etwa $\frac{1}{8}$ des gesamten Kernquerschnitts ein.

Mitochondrien und Peroxisomen waren in etwa gleicher Menge vorhanden und zeigten nur geringe Heterogenität. Intramitochondriale Granula kamen regelmäßig vor.

Tab. 20: Semiquantitative Analyse der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber weiblicher Medakas (*Oryzias latipes*, F₁) nach Exposition gegenüber Octylphenol

		Wasser	DMSO	Octylphenol			17β-Estradiol
			0,01 ‰	2 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 ng/L
Intrazelluläre Gliederung		++	++	++	++/+++	++	+++
Parenchymheterogenität		+	+	++	++	++	+++
Kern	regelmäßige Form	++	++	++	++	++	+++
	zentrale Lage	+	+	+	++	++	+++
	Heterochromatin	+	+	++	+	+	+
	Nucleolus	+	++	++	++	++	++/+++
Mitochondrien	Menge	++	++/+++	+	++	++	++
	Größe	++	++	++	++	++	++
	Heterogenität	+	+/++	++	++	++	++
	intramitoch. Granula	+	±	-	-	-	+
Peroxisomen	Menge	++	++	++	++	++	++
	Größe	++	++	++	++	++	++
rER	Menge	++	++	++/+++	+++	+++	+++/++++
	Stapel	++	++	+++	++/+++	+++	+++
	Paral. Zisternen	++	++	+++	++/+++	+++	+++
	Fragmentierung	+	+	+/+++	+	++	++
	Dilatation	-	+	++	±	+	+
sER	Menge	+	+	+	+	++	-
Golgi	Menge	++	++	+	+++	+++	++
	Zisternen	++	+	+	++	++	+
	Fenestrierung	+	+	+++	++	+	++
	Aktivität	++	+	+	+/++	+++	+++
Lysosomen	Menge	++	++	++	++	++	++
	primär	+	++	++	+	+	+
	sekundär	+	+	+	+	+	+
	Myelin	+	+	++	++	+	+
	Vakuolen	+	+	+	+	+	+
	„Myelin“ in Gallencan.	+	+	+	+	-	-
Lipid	Menge	++	++	++	+++	++	+
	Lipidfelder	+++	+++	+++	+++	+++	+
	im Glykogen	+++	+++	++	+++	+++	++
	Leaflet um Lipid	-	+++	+++	-	-	-
Glykogen	Menge	++/+++	++	++	++	++	+
	part. Entspeicherung	-	-	-	-	-	++
Interzellularen geschlossen		+++	+++	+++	+++	+++	++
Fremdzellen	Makrophagen	-	+	+	+	+	+

- Merkmal fehlt

+ selten

++ Merkmal deutlich ausgeprägt

+++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt

++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden oder ausgeprägt

 nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen

 leichter Unterschied zu den Kontrollen

 deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

6. Life Cycle-Experiment Octylphenol

Tab. 21: Semiquantitative Analyse der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber männlicher Medakas (*Oryzias latipes*, F₁) nach Exposition gegenüber 4-Octylphenol

		Wasser	DMSO	Octylphenol			17β-Estradiol
			0,01 %	2 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 ng/L
Intrazelluläre Gliederung		+	+	+++	++	+++	+++
Parenchymheterogenität		+++	+ / +++	+	+	+	+
	regelmäßige Form	++	++	++	++	++	+++
	zentrale Lage	+	+	+	++	++	++
	Heterochromatin	+	+	+	++	+	++
	Größe Nucleolus	++	+	+	++	++	+
Mitochondrien Menge		++	++ / +++	++	+++	++	++
	Größe	++	++	++	++	++	++
	erweiterte Cristae	-	-	-	+	+	-
	Heterogenität	+	+	+++	++	+	+++
	intramitoch. Granula	++	++	++	++	++	-
Peroxisomen Menge		+++	++	++	+++	+++	++
	Größe	+++	++	++	++	+	+
rER Menge		+	+	+ / +++	++	++	+ / +++
	Stapel	+	+	++	++	++	++
	Paral. Zisternen	+	+	++	++	++	++
	Fragmentierung	++	++	++	++	++ / +++	++
	Dilatation	-	-	+	++	+	+ / +++
sER Menge		+	+	++	++	++ / +++	++
Golgi Menge		+	+	+	+	++ / +++	+
	Zisternen	+	+	+	+	++	++
	Fenestrierung	++	++	++	++	+	+
	Aktivität	+	+	++	++	++	+++
Lysosomen Menge		++	+	++	++	+ / +++	+
	sekundär und tertiär	++	-	+	++	±	+
	Myelin	-	+	++	+	- / ++	+
	Vakuolen	+	+	+	+	+ / +++	+
	„Myelin“ in Gallencan.	-	-	-	-	++	-
Lipid Menge		+++	+ / +++	++	+	++	+
	Lipidfelder	++	±	++	++	++	-
	im Glykogen	++	±	++	++	+	+
	Leaflet um Lipid	+++	-	+	++	-	-
Glykogen Menge		++	+++	+++	+++	+++	++
	part. Entspeicherung	+++	-	-	++	-	-
Interzellularen geschlossen		++	+++	+++	+++	+++	+++
Fremdzellen Makrophagen		±	+	+	+	+	+

- Merkmal fehlt
 + selten
 ++ Merkmal deutlich ausgeprägt
 +++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt
 ++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden oder ausgeprägt

■ nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen
 □ leichter Unterschied zu den Kontrollen
 ■ deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

Das rauhe endoplasmatische Reticulum lag in lockerer Anordnung in Stapel aus bis zu 15 parallelen Zisternen über den Zellquerschnitt verteilt. Der Fragmentierungsgrad war verhältnismäßig gering. Die Dictyosomen bestanden aus bis zu vier meist langgestreckten Zisternen, die häufig etwas fenestriert waren (Abb. 126). Die Aktivität des Golgi-Apparates war deutlich erkennbar. Allerdings waren die abgeschnürten Vesikel verhältnismäßig klein und von geringer Dichte (helle Färbung).

Lysosomen und Myelinwirbel waren selten, dafür kamen myelinartige Strukturen in den Gallencanaliculi regelmäßig vor. Das Parenchym der männlichen Kontrolltiere war durch das Vorhandensein erweiterter Interzellularen sowie das Auftreten von Makrophagen verhältnismäßig inhomogen. Auch die intrazelluläre Gliederung zeigte aufgrund einer partiellen Entspeicherung der Glykogenareale ein unregelmäßiges Bild (Abb. 127). Die Glykogenspeicher bildeten nicht einheitliche Speicherareale, sondern lagen teilweise unregelmäßig im Cytoplasma als kleine Glykogenansammlungen vor. Die Glykogen- wie auch die Lipidmenge war insgesamt relativ hoch. Die Lipidtropfen waren meist innerhalb der Glykogenspeicher zu Feldern kumuliert und von einer sehr dicken Schicht einer myelinartigen Matrix („Leaflet“) umgeben. Wie auch bei den Weibchen war der Zellkern von gleichmäßiger Form und besaß nur wenig Heterochromatin. Das den Zellkern umgebende Cytoplasma verfügte über eine vergleichsweise geringe Menge gleichförmiger Mitochondrien. Im Gegensatz dazu waren teilweise sehr große Peroxisomen in großer Anzahl zu finden (Abb. 128). Die Peroxisomen wiesen wie auch die Mitochondrien eine enge Assoziation mit dem rER auf. Oft waren sie von einer einzelnen rER-Zisterne umgeben. Es lagen meist 3-4 sehr kurze rER-Zisternen parallel nebeneinander. Eine Stapelbildung war selten. Im Gegensatz dazu war die Fragmentierung der rER-Zisternen relativ hoch. Dictyosomen bestanden meist nur aus wenigen sehr kurzen Zisternen von geringer Aktivität (Abb. 128). Im Gegensatz dazu traten Lysosomen häufig auf.

Lösungsmittelkontrolle (0,01 % DMSO)

Bei den Weibchen der Lösungsmittelkontrolle konnten nur geringfügige Veränderungen zur Wasserkontrolle beobachtet werden. Im Vergleich zu den Weibchen der Wasserkontrolle war die Mitochondrienmenge sowie deren Heterogenität leicht erhöht. Die rER-Menge blieb unverändert, der Fragmentierungsgrad der rER-Zisternen war sichtbar verringert. Allerdings traten bei Belastung mit DMSO gelegentlich dilatierte rER-Bereiche auf. (Abb. 129) Auch die Dictyosomen bestanden aus nur zwei Zisternen und wiesen eine geringe Aktivität auf (Abb. 130).

Das Leberparenchym der Männchen war durch das Fehlen erweiterter Interzellularen wesentlich homogener. Die Größe des Nucleolus war gegenüber den Wasserkontrollen verringert. Die Mitochondrienmenge zeigte eine leichte Zunahme, dagegen nahm die Peroxisomen- sowie die Lysosomenmenge deutlich ab. Auch bei den Lipidspeichern konnte ein deutlicher Rückgang beobachtet werden. Darüber hinaus fehlte das Leaflet um die Lipidtropfen. Im Gegensatz zum Rückgang in der Menge der Lipidspeicher konnte eine markante Zunahme der Glykogenspeicher beobachtet werden (Abb. 131). Damit war das Glykogen auch gleichmäßiger im Zellquerschnitt verteilt, d.h. nicht mehr so stark in Feldern organisiert. Die Dictyosomen waren mit denen der Hepatocyten aus der Wasserkontrolle vergleichbar (Abb. 132).

2 µg/L Octylphenol

Das Leberparenchym der mit 2 µg/L Octylphenol belasteten Weibchen wies aufgrund vereinzelt auftretender Fremdzellen sowie dem häufigen Verlust der hexagonalen Form der Hepatocyten eine leicht erhöhte Heterogenität auf. Die Glykogenmenge nahm im Vergleich zu den Wasserkontrollen ab. Wie auch schon bei der DMSO-Kontrolle waren die Lipidtropfen mit einem Leaflet umgeben. Der Zellkern zeigte eine leichte Zunahme der Heterochromatinmenge. Die Mitochondrienmenge war gegenüber den Wasserkontrollen leicht verringert während die Heterogenität der Mitochondrien zunahm und keine intramitochondralen Granula mehr auftraten. Die deutlichste Veränderung stellte jedoch die Proliferation des Proteinsyntheseapparates dar. Die rER-Menge war deutlich erhöht. Die rER-Zisternen bildeten in Kernnähe einen Ring von bis zu 3 parallelen Zisternen während sie in der Peripherie in Stapel von bis zu 21 parallelen Zisternen übereinander lagen (Abb. 133). Nach Belastung mit 2 µg/L Octylphenol konnte auch erstmals eine Zunahme dilatierter rER-Bereiche beobachtet werden. Die Menge der Dictyosomen nahm generell etwas ab, der Fragmentierungsgrad war erhöht, jedoch erhielten die Golgi-Zisternen und Vesikel bei dieser Konzentration erstmals eine wesentlich dunklere Färbung.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 125: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle, ♀**; Die Hepatocyten zeigen eine deutliche intrazelluläre Gliederung in ausgedehnte Cytoplasma- und kleine Speicherareale. Das rER liegt in lockerer Anordnung in Stapeln von bis zu maximal 15 parallelen Zisternen übereinander und ist merklich fragmentiert. 7.400 x

Abb. 126: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle, ♀**; Der Golgi-Apparat besteht aus bis zu vier langgestreckten Zisternen. Die Aktivität ist vergleichsweise gering. Die abgeschnürten Vesikel besitzen eine unregelmäßige Form und helle Färbung. 30.000 x

Abb. 127: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle, ♂**; Die männlichen Hepatocyten weisen aufgrund teilweise entspeicherter Glykogenareale (in diesem Zellanschnitt sehr klein!) eine etwas inhomogenere intrazelluläre Gliederung auf. Auffällig ist die hohe Anzahl verhältnismäßig großer Peroxisomen (Pfeilköpfe). Die rER-Menge ist gering. Außerdem weisen die rER-Zisternen einen relativ hohen Fragmentierungsgrad auf. 9.000x

Abb. 128: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle, ♂**; Die Dictyosomen sind sehr klein und zeigen eine sehr geringe Aktivität. 29.000 x

Das Leberparenchym der männlichen Medakas war sehr homogen. Die intrazelluläre Gliederung der Hepatocyten war gegenüber den Wasserkontrollen wesentlich deutlicher ausgeprägt, da eine klare Trennung zwischen peripheren Speicher- und zentralen Cytoplasmaarealen vorlag (Abb. 134). Die Lipidmenge war verringert und korrelierte damit mit dem Rückgang der Peroxisomenmenge im Vergleich zur Wasserkontrolle. Die Mitochondrienmenge blieb unverändert, jedoch konnten neben ovalen bis birnenförmigen Anschnitten auch langgestreckte und verzweigte Mitochondrien beobachtet werden. Wie bereits bei den Weibchen konnte auch bei den Männchen eine Zunahme der rER-Menge verzeichnet werden. Das rER lag als Ring aus maximal vier bisweilen dilatierte parallelen Zisternen um den Kern (Abb. 134). Die Dictyosomen zeigten eine leichte Aktivitätszunahme.

20 µg/L Octylphenol

Die mit 20 µg/L Octylphenol belasteten Medakaweibchen zeigten gegenüber der niedrigsten Konzentration nur wenige Veränderungen. Insgesamt war die intrazelluläre Gliederung aufgrund klar abgegrenzter Speicherareale erhöht. Die Lipidmenge nahm zu (Abb. 135). Leaflets um die Lipidtropfen fehlten. Die rER-Menge blieb im Vergleich zu einer Belastung mit 2 µg/L Octylphenol unverändert, jedoch lagen die rER-Zisternen wesentlich enger beieinander. Die Zisternen waren langgestreckt und nur wenig fragmentiert und dilatiert. Der Golgi-Apparat bestand aus auffällig dunkel gefärbten leicht fenestrierten Zisternen. Die Aktivität war im Vergleich mit der niedrigsten Octylphenolkonzentration etwas erhöht.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 129: Medaka (*Oryzias latipes*), **DMSO-Kontrolle, ♀**; Die Hepatocyten zeigen eine leichte Zunahme der Mitochondrienmenge und -heterogenität. Das rER weist bisweilen deutlich dilatierte Bereiche auf. 7.600 x

Abb. 130: Medaka (*Oryzias latipes*), **DMSO-Kontrolle, ♀**; Die Dictyosomen bestehen aus maximal drei parallelen Zisternen. Die Aktivität ist sehr gering. 30.000 x

Abb. 131: Medaka (*Oryzias latipes*), **DMSO-Kontrolle, ♂**; Die Lipidmenge ist gegenüber den Wasserkontrollen leicht verringert während die Glykogenspeicher sich deutlich vergrößern. Die Peroxisomenmenge wie auch die Anzahl der Lysosomen erfährt eine Reduktion. 7.800 x

Abb. 132: Medaka (*Oryzias latipes*), **DMSO-Kontrolle, ♂**; Ausprägung und Aktivität des Golgi-Apparats ist mit denen der Wasserkontrolle vergleichbar. 29.000 x

Die mit 20 µg/L Octylphenol belasteten männlichen Hepatocyten besaßen auffällig wenig Lipid. Dafür waren die Glykogenspeicher verhältnismäßig groß, wenn auch teilweise entspeichert. Die Mitochondrienmenge war gegenüber den Wasserkontrollen erhöht: die leicht heterogenen Mitochondrien lagen häufig in Gruppen zusammen. Die rER-Menge zeigte ebenfalls eine Zunahme. Häufig lagen 5-6 parallele rER-Zisternen in Kernnähe beieinander (Abb. 136).

50 µg/L Octylphenol

Bei den Weibchen waren als einzige auffällige Veränderungen gegenüber der Belastung mit 20 µg/L Octylphenol eine leichte Zunahme der rER-Menge. Das rER bildete Stapel aus bis zu 23 parallelen Zisternen, welche sich fast über den gesamten Zellquerschnitt erstreckten (Abb. 137). Dabei zeigten die rER-Zisternen eine leichte Zunahme der Fragmentierung. Die Menge der Dictyosomen war deutlich erhöht, ebenso deren Aktivität.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 133: Medaka (*Oryzias latipes*), **2 µg/L Octylphenol, ♀**; Das rER ist mit Stapeln von bis zu 21 Zisternen über den gesamten Zellquerschnitt verteilt. Die Dictyosomen besitzen eine auffällig dunkle Färbung. 7.600 x

Abb. 134: Medaka (*Oryzias latipes*), **2 µg/L Octylphenol, ♂**; Die männlichen Hepatocyten verfügen über auffallend große Glykogenspeicher. Die Lipidmenge ist dagegen etwas verringert. Das rER erfährt eine leichte Zunahme; Es liegt in bis zu vier parallelen Zisternen hauptsächlich in Kernnähe. 8.100 x

Abb. 135: Medaka (*Oryzias latipes*), **20 µg/L Octylphenol, ♀**; Besonders markant ist die signifikante Zunahme der Lipidmenge. Im Gegensatz zur DMSO-Kontrolle und den mit 2 µg/L Octylphenol belasteten Weibchen fehlt hier das Leaflet um die Lipidtropfen. Die Erscheinungsform des rER ist vergleichbar mit den gegenüber 2 µg/L Octylphenol exponierten Weibchen. Demgegenüber stellt sich der Golgi-Apparat der Zelle als dunkle, deutlich fragmentierte Zisternen dar, welche eine leicht erhöhte Aktivität aufweisen. 7.600 x

Abb. 136: Medaka (*Oryzias latipes*), **20 µg/L Octylphenol, ♂**; Die Hepatocyten besitzen auffällig wenig Lipid. Die Glykogenspeicher sind zwar groß, jedoch teilweise entspeichert. Das rER erfährt eine Mengenzunahme und liegt in bis zu 5-6 parallelen Zisternen überwiegend in Kernnähe. Das Heterochromatin im Kern ist etwas stärker kondensiert. 7.400 x

Die Hepatocyten männlicher Medakas wiesen aufgrund scharf abgegrenzter Speicherareale eine klare intrazelluläre Gliederung auf (Abb. 138). Die Lipidmenge war gegenüber den Wasserkontrollen deutlich verringert. Die zahlreichen Mitochondrien zeigten nur eine geringe Heterogenität, besaßen aber vereinzelte erweiterte Cristae. Die markantesten Veränderungen fanden jedoch auch bei den mit 50 µg/L Octylphenol belasteten Männchen im Proteinsyntheseapparat statt. Die rER-Menge war gegenüber den mit 20 µg/L Octylphenol belasteten Tieren erhöht. Der Zellkern war von einem Ring von bis zu 4 parallelen häufig fragmentierten Zisternen umgeben, während sich in der Peripherie bis zu 6 parallele Zisternen zu Stapeln formierten. Auch die Dictyosomen erfuhren eine Zunahme in Menge und Aktivität. Die sonst nur bei den Weibchen zu beobachtenden dunklen Vesikel traten hier erstmalig auch bei den Männchen auf (Abb. 138).

Positivkontrolle (100 ng/L 17β-Estradiol)

Die mit 100 ng/L 17β-Estradiol belasteten Medakaweibchen zeigten durch das Auftreten von erweiterten Interzellularen ein inhomogeneres Leberparenchym. Dagegen war die intrazelluläre Gliederung sehr deutlich ausgeprägt. Die Glykogenmenge war vergleichsweise gering und zeigte häufig partielle Entspeicherungen. Auch die Lipidmenge war auffällig gering. Der Zellkern hatte häufig eine langgestreckte ovale Form und beherbergte einen großen Nucleolus (Abb. 139).

Gegenüberliegende Seite

Abb. 137: Medaka (*Oryzias latipes*), **50 µg/L Octylphenol**, ♀; Die rER-Menge nimmt leicht zu. Das rER bildet Stapel aus bis zu 23 parallelen Zisternen, welche sich fast über den gesamten Zellquerschnitt erstrecken. Die Menge der Dictyosomen ist ebenso wie deren Aktivität deutlich erhöht. 7.100 x

Abb. 138: Medaka (*Oryzias latipes*), **50 µg/L Octylphenol**, ♂; Die männlichen Hepatocyten zeigen eine klare intrazelluläre Gliederung. Die rER-Menge ist erhöht. Auch die Menge und Aktivität der Dictyosomen nimmt auffällig zu. Die sonst nur bei den Weibchen zu beobachtenden dunklen Vesikel traten hier erstmalig auch bei den Männchen auf. 7.600 x

Abb. 139: Medaka (*Oryzias latipes*), **100 ng/L 17β-Estradiol**, ♀; Die Glykogenspeicher sind vergleichsweise klein und häufig leicht entspeichert. Auch die Lipidmenge ist verringert. Der Zellkern beherbergt einen auffällig großen Nucleolus. Die rER-Menge ist wie auch die Menge und Aktivität der Dictyosomen erhöht. 7.600 x

Abb. 140: Medaka (*Oryzias latipes*), **100 ng/L 17β-Estradiol**, ♂; Das rER der männlichen Hepatocyten zeigt durch die Belastung mit 17β-Estradiol gegenüber den Wasserkontrollen nur eine leichte Mengenzunahme. Bei den Dictyosomen kann keine Mengenzunahme, wohl aber eine Aktivitätszunahme beobachtet werden. 7.100 x

Die rER-Menge erhöhte sich in der Positivkontrolle weiter. Das rER war in Kernnähe in Stapeln von bis zu sechs, in der Peripherie sogar in Stapeln von bis zu 19 parallelen Zisternen anzutreffen. Eine weitere Auffälligkeit stellte bei dieser Konzentration das Auftreten großer Gruppen etwa mitochondriengroßer dunkler Vesikel dar. Eine genaue Identifikation erwies sich als schwierig, jedoch handelt es sich hierbei aufgrund der Nähe zu den Dictyosomen und dem Fehlen einer Assoziation mit dem rER wahrscheinlich nicht um Peroxisomen, sondern um Vesikel, die vom Golgi-Apparat abgeschnürt wurden (Abb. 139).

Der Zellkern der Medakamännchen zeigte einen meist kreisrunden und gleichmäßigen Querschnitt. Die Heterochromatinmenge war im Vergleich mit den Kontrollen etwas erhöht. Die Mitochondrien wiesen eine verhältnismäßig hohe Heterogenität auf. Intramitochondriale Granula kamen nicht vor. Das rER der männlichen Hepatocyten erfuhr durch die Belastung mit 17 β -Estradiol gegenüber den Wasserkontrollen nur eine leichte Mengenzunahme. Auch bei den Dictyosomen konnte keine Mengenzunahme, wohl aber eine Aktivitätszunahme beobachtet werden. Allerdings erwies sich auch hier die Unterscheidung zwischen Peroxisomen und Golgivesikeln als schwierig (Abb. 140).

6.3 Diskussion

Die Belastung des Medaka (*Oryzias latipes*) mit Octylphenol resultierte in Veränderungen der Befruchtungsrate und des Reproduktionserfolges sowie des Geschlechterverhältnisses. Eine erhöhte Mortalitätsrate der Nachkommen octylphenol-exponierter Medakas ist gut dokumentiert und zeigt eine negative Korrelation zwischen der Octylphenolkonzentration und dem Schlüpfertag der Larven (Gray et al. 1999b). Anhand der Ergebnisse der Kreuzungsexperimente konnte ein signifikanter Anstieg der Mortalität bei den Nachkommen octylphenol-belasteter Weibchen und Kontrollmännchen gezeigt werden. Andererseits konnte bei den Nachkommen belasteter Männchen und Kontrollweibchen erst ab der Exposition gegenüber 50 μ g/L Octylphenol ein signifikanter Anstieg der Mortalität beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Überleben der Nachkommen exponierter Eltern stärker durch die Exposition der Weibchen als der Männchen gegenüber Octylphenol beeinträchtigt wird. Diese Beobachtung könnte mit der Anreicherung von Octylphenol in der Eizelle während der Oogenese erklärt werden, welche bei belasteten Weibchen zusätzlich zur direkten Exposition der Eier stattfindet. In Untersuchungen mit *o,p'*-DDT konnte gezeigt werden, dass die Eier exponierter Weibchen ähnliche Mengen *o,p'*-DDT enthielten wie die Weibchen selbst (Metcalf et al. 2000). Die Bioakkumulation von Alkylphenolen wurde in zahlreichen Studien untersucht (Tsuda et al. 2000, Thibaut et al. 1998, Mehdal et al. 1996, Lewis & Lech 1996). Aufgrund der Lipophilie von *o,p'*-DDT und Alkylphenolen gibt es Grund zur Annahme, dass die Eier von mit Alkylphenolen belasteter Weibchen ähnliche Konzentrationen wie die Weibchen selbst aufweisen. Eine Belastung während der Oogenese könnte daher zu einer Verringerung der Eizellqualität und/oder zu einer Schädigung der reifenden Eizelle führen.

Andererseits erscheint die Annahme einer additiven Wirkung von maternalem Transfer und direkter Exposition der Eier auch deshalb einsichtig, da die teratogene und estrogene Wirkung von Octylphenol in verschiedenen Studien (Gronen et al. 1999, Raychoudhury et al. 1999, McLeese et al. 1981, Gray et al. 1999b) wie auch durch in der vorliegenden Untersuchung der Embryonalentwicklung der F₁-Generation belegt werden konnte. Das Fehlen eines signifikanten Unterschieds in der Mortalität der

mit 17 β -Estradiol belasteten Paarungsgruppen im Kreuzungsexperiment sowie einer nur leicht erhöhten Mortalitätsrate in der Positivkontrolle der F₂-Generation im Gegensatz zur deutlich erhöhten Mortalitätsrate in der F₁-Generation lässt sich möglicherweise durch adaptive Prozesse erklären.

Ein weiterer wesentlicher Effekt der Octylphenolbelastung war die Verzögerung des Wachstums, wie sie auch nach Exposition gegenüber anderen Xenöstrogenen häufig beobachtet werden konnte (Ashfield et al. 1998, Donaldson et al. 1979, Ostrowski & Garling 1986, Herman & Kinclaid 1988), steht jedoch auch im Widerspruch zu anderen Arbeiten. Ashfield et al. (1998) zeigten bei jungen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) ein geringeres Wachstum nach Exposition gegenüber Alkylphenolen und nahmen an, dass durch die Beeinflussung der östrogenen Aktivitäten (z. B. Vitellogenese) durch diese Substanzen die für das Wachstum benötigten Energiereserven abgezogen werden. Darüber hinaus interagieren Östrogene mit anderen Hormonen wie z. B. den Schilddrüsenhormonen T₃ und T₄, welche eine wichtige Rolle beim Wachstum von Vertebraten spielen. Holloway & Leatherland (1997) wiesen einen verringerten T₃ und T₄ Plasmaspiegel bei juvenilen Regenbogenforellen nach, denen intraperitoneal 17 β -Estradiol verabreicht wurde. Das Fehlen eines merklichen Längenunterschieds zwischen Männchen und Weibchen ab Konzentrationen ≥ 20 $\mu\text{g/L}$ Octylphenol in der vorliegenden Untersuchung kann darauf hindeuten, dass Medakaweibchen stärker von der Exposition betroffen sind und/oder aber mehr Energie in die Vitellogenese umleiten. Als ein Hinweis auf die Richtigkeit dieser Annahme kann die Zunahme der durchschnittlichen und maximalen Eizahl pro Weibchen im Life Cycle gewertet werden. Das verringerte Wachstum unter Belastung mit Octylphenol stellt eine weiteren reproduktions- und populationsrelevante Veränderung dar, da einerseits das Überleben in der Umwelt stark von der Körpergröße abhängt und andererseits der ovosomatische Index einen kritischen Faktor für eine erfolgreiche Reproduktion darstellt (Vos et al. 2000). Außerdem ist Wachstum der endgültige Ausdruck der Fischgesundheit und Fitness, da es alle biotischen und abiotischen Variablen zusammenfasst, welche auf einen Organismus wirken. Es spiegelt damit auch die Wirkung von chronischem Stress wider (Adams & McLean 1985).

Allerdings stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu den Untersuchungen von Malison et al. (1988), welche eine Längenzunahme nach Belastung mit 17 β -Estradiol beim Gelbbarsch (*Perca flavescens*) nachweisen konnten und der Arbeit von Gray et al. (1999b), die Medakas ab unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Schlüpfen bis zur Geschlechtsreife mit Octylphenol belasteten und keine Korrelation zwischen Octylphenolkonzentration und verändertem Wachstum feststellen konnten. Der Umstand, dass in der vorliegenden Untersuchung trotz des ähnlichen Versuchsdesigns wie bei Gray et al. (1999b) konzentrationsabhängige Wachstumsunterschiede zu beobachten waren, könnte aus der bereits sehr früh nach der Befruchtung in die Entwicklung eingreifenden kontinuierlichen Belastung mit Octylphenol resultieren.

Eine weitere Beeinträchtigung durch Octylphenol stellt die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses sowie die Induktion von Mischgonaden dar. Der Medaka ist ein differenzierter Gonochorist (Yamamoto 1969), d. h. unter normalen Bedingungen treten weder spontane Geschlechtsumkehrung noch Mischgonaden auf (Yamamoto 1965, 1962). Dennoch ist seit langem bekannt, dass durch die Gabe von Östrogenen genetische Männchen in Weibchen umgewandelt werden können (Yamamoto 1953, 1959). Papulias et al. (2000) wiesen nach, dass schon eine einzige Injektion mit 0,5-2,5 ng/Ei 17 β -Estradiol während der Embryonalentwicklung eine Geschlechtsumkehr bei genetischen Männchen bewirken kann.

Gray et al. (1999a) konnten anhand ihrer Untersuchungen keine auffälligen Verschiebungen bei der Ausdifferenzierung des Geschlechts unter Octylphenolbelastung beobachten. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie widersprechen jedoch Gray et al. (1999a), da sie zeigen, dass eine Octylphenolbelastung vor dem Zeitpunkt des Schlüpfens die Geschlechtsdeterminierung wesentlich beeinflussen kann. Dies ist um so erstaunlicher, wenn man bedenkt, dass beim Medaka die kritische Phase für die Geschlechtsdifferenzierung des männlichen Geschlechts um den 13. Tag liegt (Yamamoto 1975). Deshalb legen die vorliegenden Ergebnisse die Vermutung nahe, dass eine Exposition gegenüber Octylphenol vor dem Zeitpunkt des Schlüpfens möglicherweise über eine Verschiebung des endokrinen Gleichgewichts, eine wichtige Rolle bei der Geschlechtsumkehr männlicher Medakas spielt. Andererseits ist die Anzahl der Männchen mit Zwittergonaden in der vorliegenden Studie geringer als in anderen Untersuchungen (Gray et al. 1999a). Generell findet das Auftreten einer Geschlechterverschiebung bisher nur in wenigen Untersuchungen Beachtung. Dieses Phänomen könnte jedoch populationsbiologisch zu wesentlich schwerwiegenderen Beeinträchtigungen der Reproduktivität führen als das vereinzelte Auftreten von Zwittergonaden.

Die Ergebnisse des Kreuzungsexperiments zeichnen ein differenziertes Bild der beobachteten Verringerung der Befruchtungsrate nach Belastung mit Octylphenol und 17β -Estradiol. Die Exposition gegenüber Octylphenol bewirkte in der Paarungsgruppe belastete Männchen x Kontrollweibchen einen deutlichen Rückgang des Befruchtungserfolges, während er bei den belasteten Weibchen und Kontrollmännchen im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen leicht erhöht war. Nikula et al. (1999) konnten in einem *In vitro*-Experiment nachweisen, dass Octylphenol die Steroidbildung in den Leydig'schen Zellen männlicher Ratten stört. Sie vermuteten daher, dass dies auch *in vivo* erfolgen und so die normale Funktion der Hoden beeinträchtigen könnte. Eine Fehlfunktion der Leydig'schen Zellen könnte auch die eng mit ihnen korrelierten Sertolizellen beeinflussen, welche für die Versorgung der wachsenden Spermatogonien verantwortlich sind. Dies kann der Grund für eine Verringerung der Spermienqualität und -menge sein, wie sie *in vitro* (Ranchoudhury et al. 1999) und *in vivo* (Blake & Boockfor 1997, Boockfor & Blake 1997) nachgewiesen wurde und eine Erklärung für den verringerten Befruchtungserfolg der belasteten männlichen Medakas im Kreuzungsexperiment der vorliegenden Studie liefern. Zusätzlich zeigte die Untersuchung von Gray et al. (1999b), dass der Rückgang im Befruchtungserfolg männlicher Medakas durch eine Veränderung im Paarungsverhalten (allgemeine Passivität, Verringerung der Annäherungen an die Weibchen und geringere Anzahl der Besamungsversuche) hervorgerufen wird.

Der leichte Anstieg der Befruchtungsrate bei der Verpaarung von unbelasteten Weibchen mit belasteten Männchen ist dagegen schwieriger zu erklären. Möglicherweise verursacht der octylphenolinduzierte Anstieg der Gelegegröße der Weibchen eine sexuelle Stimulation der Männchen. Eine andere Möglichkeit wäre eine verstärkte sexuelle Aktivität der Weibchen. Über Veränderungen im Verhalten weiblicher Fische durch die Exposition gegenüber Xenoöstrogenen ist bisher wenig bekannt, deshalb können hier ohne ausführliche Verhaltensstudien keine Aussagen gemacht werden.

Die beobachteten ultrastrukturellen Veränderungen bilden einen weiteren Hinweis auf das endokrine Potential von Octylphenol. Wie bereits bei in den Experimenten mit Nonylphenol gezeigt werden konnte, stellt die Proliferation der rER-Menge und der Dictyosomen sowie die Aktivitätszunahme der Golgi-Zisternen einen Hinweis auf eine verstärkte (Lipo-)Proteinsynthese dar. Eine weitere Beobachtung war die dunklere Färbung der Golgi-Zisternen und -Vesikel, die bei den Weibchen ab Konzentrationen $\geq 2 \mu\text{g/L}$ Octylphenol und bei den Männchen bei einer Belastung mit $50 \mu\text{g/L}$ Octylphenol

auftrat. Diese Veränderung gibt einen Hinweis darauf, dass entweder durch die Belastung mit Octylphenol andere oder aber größere Mengen an Lipoproteine produziert werden und steht möglicherweise im unmittelbaren Zusammenhang mit der Induktion der Vitellogeninsynthese (Peute et al. 1979). Das klare Zusammenwirken von rER-Proliferation und Abnahme der Glykogenspeicher konnte bereits bei Fröschen (Philipps et al. 1987) im Zusammenhang mit der Vitellogenese und beim Zebrafisch (*Danio rerio*) nach Exposition gegenüber 1 µg/L 17β-Estradiol (Peute et al. 1985) beobachtet werden. Zusätzlich konnte bei den Zebrafischen die Proliferation der Dictyosomen beobachtet werden. Die übrigen Veränderungen der Leberultrastruktur waren dagegen eher unspezifischer Natur (Abnahme der Lipidspeicher, Zunahme der Mitochondrienheterogenität, Zunahme der Parenchymheterogenität bei den Weibchen) und weisen auf unspezifischen Stress sowie eine generelle Aktivierung des Zellstoffwechsels hin (Braunbeck et al. 1990, 1992, 1998).

Eine chronische Belastung mit Octylphenol verursachte eine ganze Reihe an populationsrelevanten Einschränkungen. Es ist festzustellen, dass die hier verwendeten Konzentrationen die in der aquatischen Umwelt gefundenen um das 2-50fache überschreiten, so dass von Octylphenol als Monosubstanz kaum eine echte östrogene Gefährdung ausgehen sollte. Dennoch konnten im Versuch bereits bei umweltrelevanten Konzentrationen adverse Effekte *in vitro* beobachtet werden (Raychoudhury et al. 1999), so dass dennoch ein gewisses Gefährdungspotential bestehen bleibt, insbesondere wenn man Kombinationswirkungen mit anderen Xenoöstrogenen in der Umwelt in Betracht zieht.

7. Untersuchungen zur Wirkung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf den Medaka (*Oryzias latipes*) im Life Cycle

Zusammenfassung: Medakas wurden bis zur Geschlechtsreife mit 100 ng/L, 2, 20 und 100 µg/L Dehydroepiandrosteron (DHEA) belastet. Zusätzlich wurden Medakas gegenüber einer Wasser- und Lösungsmittelkontrolle (0,01 % DMSO) exponiert.

Bezüglich der Sterblichkeit konnten nur bei 100 ng/L DHEA erhöhte Werte beobachtet werden. Nach Belastung mit 100 µg/L DHEA konnte ein signifikant verringertes Wachstum beobachtet werden, während die Weibchen signifikant schwerer waren. Das Geschlechterverhältnis verschob sich von 44:56 (Männchen:Weibchen) in der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle nach bis zu 92 % Männchen bei einer Konzentration von 20 µg/L DHEA. Außerdem zeigten etwa 1 % der mit 100 ng/L bzw. 2 µg/L DHEA belasteten Fische Mischgonaden. Nach Belastung mit 100 µg/L DHEA konnte ein Geschlechterverhältnis von 58:26 (Männchen:Weibchen) und 16 % Mischgonaden beobachtet werden.

Bereits ab einer Konzentration von 100 ng/L DHEA erhöhte sich die durchschnittliche Gelegegröße signifikant. Außerdem war bei Konzentrationen ≥ 2 µg/L DHEA ein signifikanter Rückgang der Befruchtungsrates festzustellen.

Geschlechtsspezifische Veränderungen durch DHEA wurden in einem Kreuzungsexperiment untersucht, in dem jeweils belastete Medakas eines Geschlechts mit unbelasteten Individuen des anderen Geschlechts verpaart wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Befruchtungsrates bei den mit 2 und 20 µg/L DHEA belasteten Männchen signifikant verringert war, bei Weibchen jedoch nur bei einer Exposition gegenüber 20 µg/L DHEA. Außerdem erhöhte sich die durchschnittliche Gelegegröße bei den belasteten Weibchen stärker als bei Belastung der Männchen. Die Analyse der Leberultrastruktur zeigte bei beiden Geschlechtern neben vielen unspezifischen Veränderungen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fragmentierung und Dilatation des rER und des Golgi-Apparates. Außerdem konnte eine dosisabhängige Kondensation des Nucleolus beobachtet werden. Die Hepatocyten mit 100 µg/L belasteten Männchen zeigten zusätzlich eine starke Peroxisomenproliferation.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Exposition von Medakas gegenüber DHEA außer zur Vermännlichung auch zu schwerwiegenden reproduktionsbiologischen Beeinträchtigungen führt und in Konzentrationen >20 µg/L sogar toxisch wirkt.

7.1 Einleitung

Dehydroepiandrosteron (DHEA) wurde in diesem Life Cycle-Experiment als Testsubstanz gewählt, da es sich hierbei um eine wichtige Zwischenstufe in der Biosynthese von Androgenen und Östrogenen (Leiter et al. 1987) handelt. DHEA ist seit langer Zeit ein Forschungsobjekt in der Humanmedizin, da es positive Wirkung auf viele altersbedingte Krankheiten wie Diabetes, Arteriosklerose, Alzheimer, Demenz und Arthrose besitzt (Kalimi & Regelson 1990, Orner et al. 1996, Regelson et al. 1990, Watson et al. 1996). Außerdem scheint DHEA eine Schutzfunktion gegen spontane, virale und chemikalieninduzierte Krebsentstehung auszuüben (Gordon et al. 1987, Schwartz et al. 1981, 1982, 1986,

Shibata et al. 1995, Wakabayashi 1995). Andererseits ist DHEA bei Ratten ein Peroxisomenproliferator und kann Leberkarzinome hervorrufen (Frenkel et al. 1990, Rao et al. 1992, Wu et al. 1989, Yamada et al. 1992). Auch bei Regenbogenforellen konnte nach Exposition gegenüber DHEA eine Induktion von Leberkarzinomen beobachtet werden, ohne dass es zu einer Peroxisomenproliferation kam (Orner et al. 1995, 1998). Aufgrund dieser negativen Effekte auf Nager und Fische ist die exzessive Nutzung von DHEA als Ernährungszusatzstoff zur Verbesserung des allgemeinen Wohlbefindens sehr umstritten, obwohl DHEA beim Menschen keine Proliferation der Peroxisomen auslöst.

Bislang liegen keine Daten über das Vorhandensein von DHEA in der aquatischen Umwelt und somit über die Umweltrelevanz dieser Substanz vor. Allerdings ist bekannt, daß DHEA mit dem Urin ausgeschieden wird (Dehennin et al. 1998). Aufgrund der Tatsache, dass DHEA in zunehmendem Maße und in hohen Dosen als „Verjüngungsmittel“ konsumiert wird, besteht die Befürchtung, dass es auf diesem Wege auch in die aquatische Umwelt gelangen könnte. Ziel dieser Untersuchung war es im wesentlichen, negative Effekte einer chronischen Belastung mit DHEA über das Wasser auf Reproduktionserfolg, Entwicklung, Geschlechterverhältnis, Vitellogenin-mRNA und Leberultrastruktur aufzuzeigen. Ein weiterer Aspekt war es, mögliche Korrelationen zu den Life Cycle-Experimenten mit Nonylphenol, Octylphenol und 17 β -Estradiol zu finden.

7.2 Wirkung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf Entwicklung, Reproduktion, Geschlechterverhältnis und Leberultrastruktur des Medakas (*Oryzias latipes*)

7.2.1 Schlüpfertag und Sterblichkeit in der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA

Bezüglich der Mortalitätsrate konnten keine Effekte von DHEA nachgewiesen werden (Tab. 22). Die Gesamtmortalität der DHEA-belasteten Tiere war ab Konzentrationen $\geq 2 \mu\text{g/L}$ DHEA sogar geringer als in der DMSO-Kontrolle. Letztere war nahezu doppelt so hoch wie bei den Wasserkontrollen. Eine ungewöhnlich hohe Mortalität war bei einer Exposition gegenüber 100 ng/L DHEA zu beobachten. Hier war die Gesamtmortalität mehr als dreimal so hoch wie bei der Wasserkontrolle. Während des Zeitraums, in dem die Tiere im Durchfluss gehalten wurden, konnten in keiner der Versuchsgruppen tote Fische beobachtet werden.

Das Wachstum der Medakas wurde durch die Wirkung von DHEA in dosisabhängiger Weise beeinflusst. Länge und Gewicht beider Geschlechter unterschieden sich nur nach Belastung mit $20 \mu\text{g/L}$ DHEA signifikant voneinander ($p = 0,018$ bzw. $0,009$), ansonsten waren die Weibchen nur tendenziell schwerer als die Männchen (Abb. 141 und 142). Im Vergleich zur Wasserkontrolle konnte bei den Männchen bereits in der Lösungsmittelkontrolle eine signifikante Verringerung des Wachstums beobachtet werden. Nach Belastung mit 2 und $20 \mu\text{g/L}$ DHEA waren die Männchen wiederum etwas größer als in den beiden Kontrollgruppen, bei $100 \mu\text{g/L}$ DHEA wiesen sie eine deutlich geringere Länge auf. Bei den Weibchen konnte dagegen nur bei einer Exposition gegenüber $100 \mu\text{g/L}$ DHEA eine signifikante Verringerung des Längenwachstums beobachtet werden.

Tab. 22: Veränderungen in der Zusammensetzung der F₁-Generation des Medaka (*Oryzias latipes*) nach kontinuierlicher lebenslanger Belastung mit Dehydroepiandrosteron (DHEA)

		Wasser		DMSO		DHEA							
						100 ng/L		2 µg/L		20 µg/L		100 µg/L	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
F ₁ - Generation Petrischalen	Befruchtete Eier	101	100	129	100	269	100	113	100	76	100	97	100
	Mortalität vor dem Schlüpfen **	20	19,8	42	32,6	166	61,7	19	8,8	12	15,8	9	9,3
	Frühe Larvalmortalität **	2	2,0	18	14,0	22	8,2	10		5	6,6	11	11,3
	Gesamt-Larvalverluste **	22	21,8	60	46,5	188	69,9	29	25,7	17	22,4	20	20,6
Aquarien	Eingesetzte Larven	79	78,2	69	53,5	81	30,1	84	74,3	59	77,6	77	79,4
	Mortalität ab Schlupf ****	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
	Größe Endpopulation	79	78,2	69	53,5	81	30,1	84	74,3	59	77,6	77	79,4
F ₂ - Generation Petrischalen	Eingesetzte Eizahl	906	100	690	100	1048	100	475	100	289	100	-	-
	Unbefruchtete Eier*	81	8,97	37	5,41	64	6,30	99	20,79	83	28,22	-	-
	Befruchtete Eier *	825	91,03	653	94,59	984	93,87	376	79,21	206	71,18	-	-
	Mortalität vor dem Schlüpfen **	28	3,39	34	5,21	72	7,32	43	11,44	7	3,40	-	-
	Frühe Larvalmortalität **	82	9,94	29	4,44	52	5,28	13	3,46	5	2,43	-	-
	Gesamt-Larvalverluste **	110	13,33	63	9,65	124	12,60	56	14,89	12	5,83	-	-
	Anzahl Larven	715	86,67	590	90,35	860	87,40	320	85,11	194	94,17	-	-

* in Bezug auf die eingesetzte Eizahl; ** in Bezug auf die befruchteten Eier; *** in Bezug auf die in die Aquarien eingesetzten Larven; **** Zahl der eingesetzten Larven - Zahl der adulten Tiere (Endpopulation), F₂-Generation: Angaben als Summe aus 3 Replikas.

7.2.1 Wachstum der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA

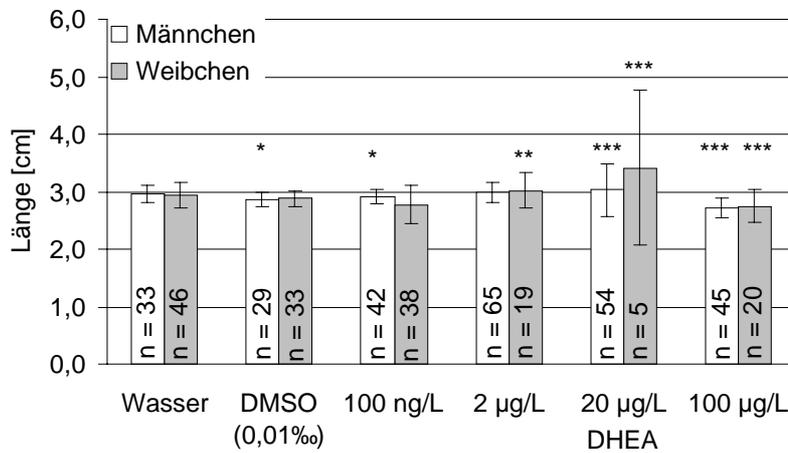


Abb. 141: Längenunterschiede in der F₁-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife. Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung aller Individuen der Versuchsgruppen. Signifikanzen nach Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

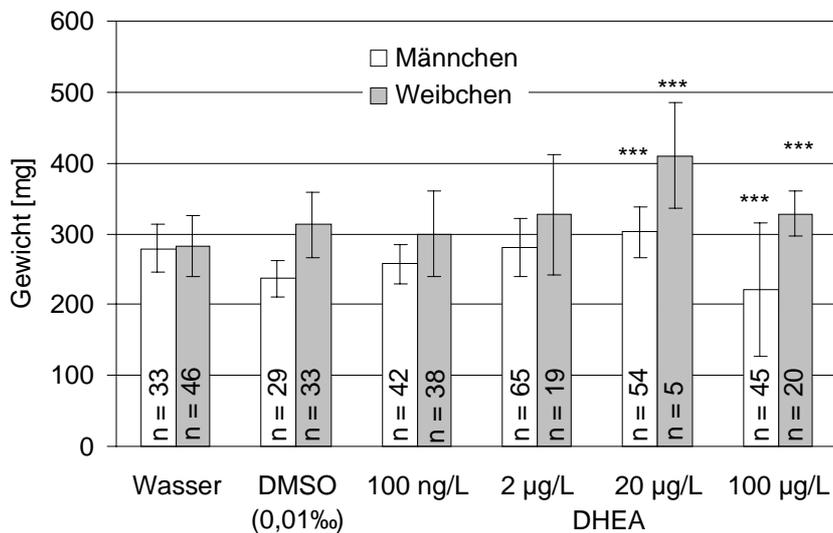


Abb. 142: Gewichtsunterschiede in der F₁-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife. Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung aller Individuen der Versuchsgruppen. Signifikanzen zu den Kontrollen nach Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Das Wachstum der Medakas wurde durch die Wirkung von DHEA in dosisabhängiger Weise beeinflusst. Länge und Gewicht beider Geschlechter unterschieden sich nur nach Belastung mit 20 µg/L DHEA signifikant ($p = 0,018$ bzw. $0,009$), ansonsten waren die Weibchen nur tendenziell schwerer als die Männchen (Abb. 141 und 142). Im Vergleich zur Wasserkontrolle konnte bei den Männchen bereits in der Lösungsmittelkontrolle eine signifikante Verringerung des Wachstums beobachtet werden. Nach Belastung mit 2 µg/L und 20 µg/L DHEA waren die Männchen größer als jene in den Kontrollgruppen, bei 100 µg/L DHEA wiesen sie eine deutlich geringere Länge auf. Bei den Weibchen konnte dagegen nur nach Exposition gegenüber 100 µg/L DHEA eine signifikante Verringerung des Längenwachstums beobachtet werden.

Einheitlicher war der konzentrationsabhängige Verlauf der Belastung bezüglich des Gewichts. Hier konnte bei beiden Geschlechtern bis zu Konzentrationen ≤ 20 µg/L DHEA ein Gewichtsanstieg beobachtet werden, während sich bei 100 µg/L DHEA das Gewicht der Männchen drastisch verringerte.

7.2.3 Geschlechterverhältnis der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA

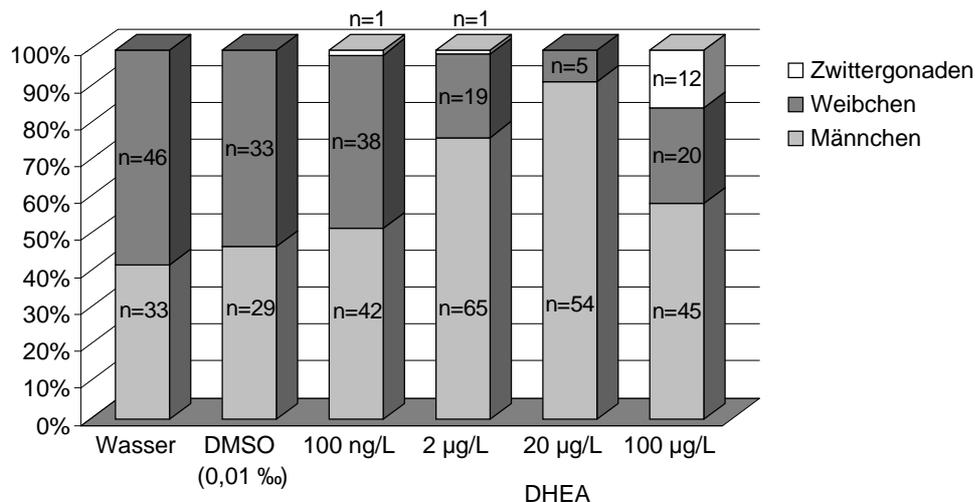


Abb. 143: Geschlechterverhältnis in der F₁-Generation von Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA. Die Werte auf den Balken beziehen sich auf die Anzahl der Individuen.

Eine Belastung mit DHEA führte zu einer auffälligen Vermännlichung der Testfische. Dies zeigte sich zum einem darin, dass die mit DHEA-belasteten Weibchen in dosisabhängiger Weise ihre sekundären Geschlechtsmerkmale verloren. Dies geschah vor allem durch die Verlängerung der Bauchflosse sowie eine Entfärbung der Flossen. Andererseits konnte eine dosisabhängige Zunahme des Männchenanteils an der Population beobachtet werden (Abb. 143).

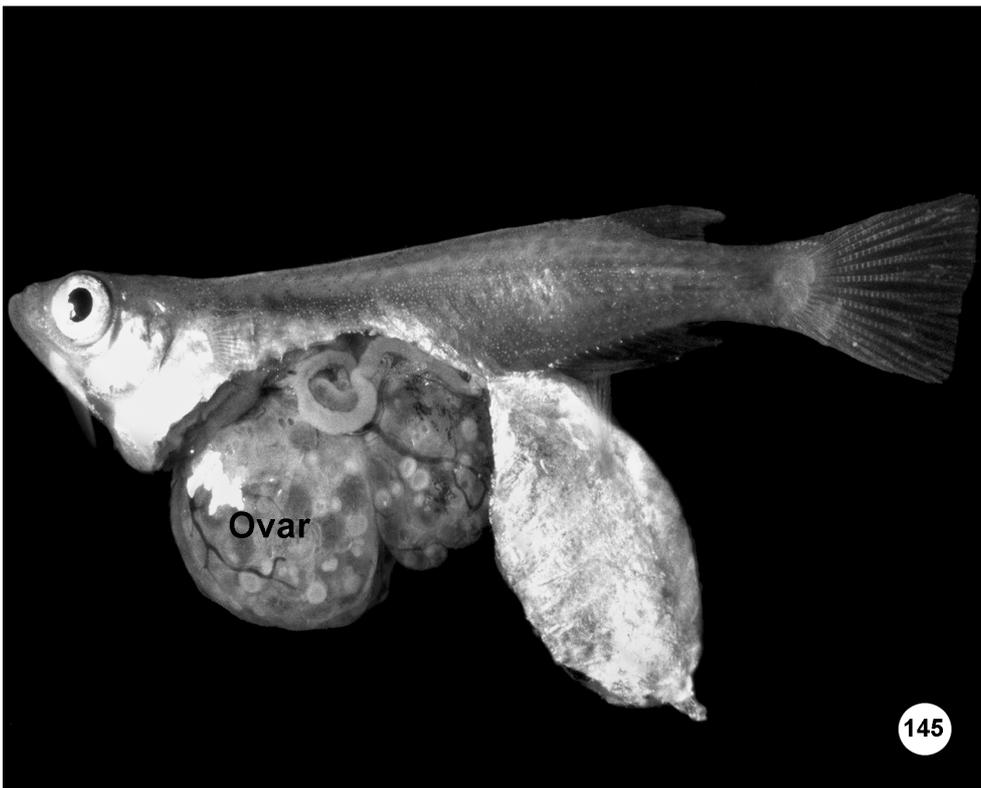


Abb. 144: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle**, ♀: Deutlich sichtbar sind die an den Urogenitalpapille gehefteten Eier. 5 x

Abb. 145: Medaka (*Oryzias latipes*), **100 µg/L DHEA**, ♀: Auffällig ist das stark vergrößerte Ovar, welches im Vergleich zu den Wasserkontrollen ungefähr die 3-4 fache Größe erreicht. 5 x

Während in der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle das Geschlechterverhältnis mit durchschnittlich 44 % Männchen und 56 % Weibchen noch nahezu ausgeglichen war, konnte bei einer Belastung mit 20 µg/L DHEA nur noch ein Anteil von 9 % der Gesamtpopulation als Weibchen identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnten bei einer Exposition gegenüber 100 µg/L DHEA wieder rund 25 % Weibchen beobachtet werden. Bei dieser Konzentration traten allerdings bei 15 % der Versuchsfische Zwittergonaden auf.

7.2.4 Histologische Veränderungen in den Gonaden der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA

Eine Belastung mit 100 µg/L DHEA verursachte bei den weiblichen Medakas einen Laichstau. Während die Kontrollweibchen eine normale Körperform aufwiesen (Abb. 144), war der Leib der Weibchen aus dem Versuchsansatz mit 100 µg/L DHEA stark aufgewölbt. Eine nähere Untersuchung dieses Phänomens ergab eine starke Hypertrophie der Ovarien (Abb. 145), da die Weibchen offensichtlich nicht mehr in der Lage waren, ihre Eier abzulaichen.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Ovarien ergab unter Belastung mit DHEA im Vergleich zu den Kontrollweibchen (Abb. 146) eine dosisabhängige, wenn auch in ihrer Ausprägung recht variable Reduktion der Primärfollikel in den Ovarien (Abb. 147).

Einige der mit Konzentrationen ≥ 20 µg/L DHEA belasteten Männchen zeigten im Vergleich mit den Kontrolltieren (Abb. 148) eine leichte Hypertrophie der Hoden (Abb. 149). Der zentral gelegene Ductus seminiferus war häufig erweitert und mit Spermien gefüllt.

Die Zwittergonaden zeigten eine individuell sehr unterschiedliche Ausprägung. Zwischen 1-40 Primärfollikel konnten im Hoden der Versuchstiere gezählt werden (Abb. 150). Bei einem mit 2 µg/L DHEA belasteten Männchen konnten sogar einige Sekundärfollikel beobachtet werden.

7.2.5 Reproduktionserfolg der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA

Bei den gegenüber DHEA exponierten Weibchen konnte ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Gelegegröße beobachtet werden. Dagegen nahm die maximale Gelegegröße nur bei den mit 100 ng und 20 µg/L DHEA belasteten Medakas deutlich zu (Abb. 151). Weibliche Medakas, die gegenüber 100 µg/L DHEA exponiert worden waren, waren nicht mehr in der Lage, Eier zu legen.

Die Befruchtungsrates der Versuchsgruppen korrelierte negativ mit der DHEA-Konzentration (Abb. 152). Während nach Belastung mit 100 ng/L DHEA kein Unterschied zu den Kontrollen zu beobachten war, sank der Wert bei einer Belastung mit 2 µg/L DHEA signifikant um 15 %, bei 20 µg/L DHEA um 26 %.

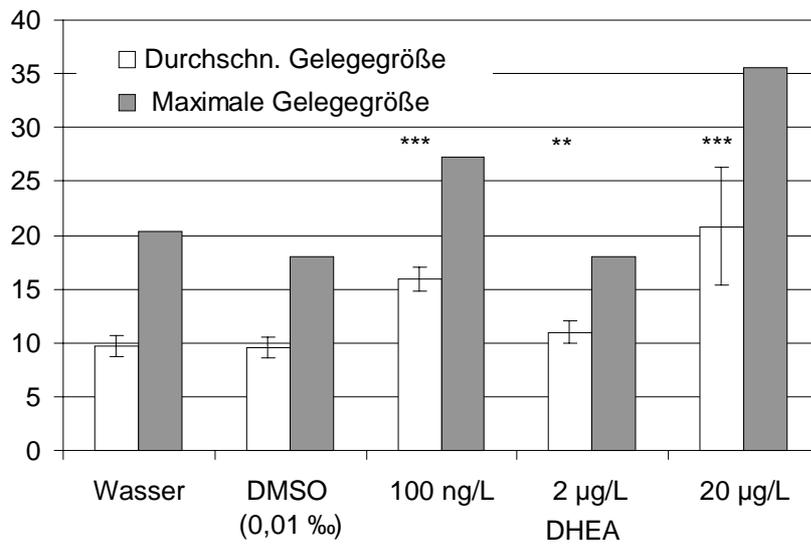


Abb. 151: Durchschnittliche und maximale Gelegegröße der F₁-Generation von Medakas nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit DHEA. Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. als Maximalwerte aus 3 Replika. Signifikanzen nach Mann-Whitney U-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

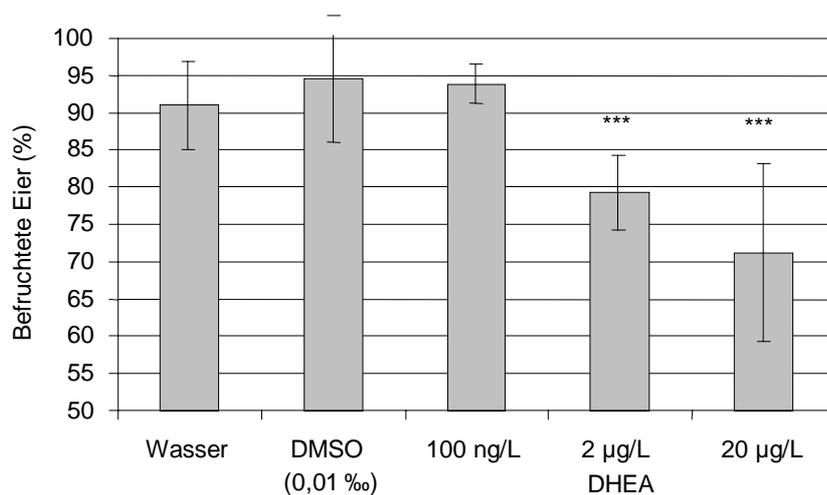


Abb. 152: Befruchtungserfolg der F₁-Generation nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit DHEA. Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. als Maximalwerte aus 3 Replika. Signifikanzen nach Mann-Whitney U-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

7.2.6 Schlüpferfolg und Sterblichkeit in der F₂-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung DHEA

Auch die F₂-Generation zeigte bei der Sterblichkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Tab. 22). Die Larvalverluste waren bei einer Exposition gegenüber 2 µg/L DHEA am höchsten, dagegen zeigten die mit 20 µg/L DHEA belasteten Larven die geringste Gesamtmortalität.

7.2.7 Kreuzungsexperimente in der F₁-Generation des Medakas (*Oryzias latipes*)

Da im Early Life Stage-Experiment kein DHEA-abhängiger Anstieg der Mortalität beobachtet werden konnte, beschränkten sich die Untersuchungen der Kreuzungsexperimente auf Gelegegröße und Befruchtungsrate bei einer Belastung mit 2 und 20 µg/L DHEA.

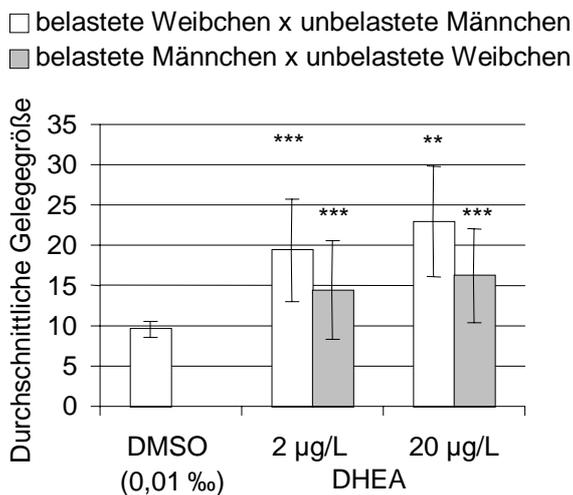


Abb. 153: Durchschnittliche Gelegegröße des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit DHEA, Kreuzungsexperiment. Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 10 bzw. 2 Brutpaaren (3 Weibchen/2 Männchen). Signifikanzen nach Mann-Whitney U-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

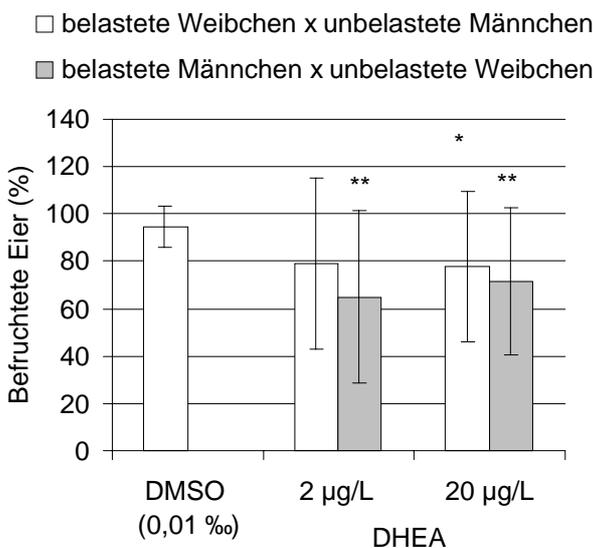


Abb. 154: Befruchtungserfolg im Kreuzungsexperiment nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung des Medakas (*Oryzias latipes*) mit DHEA. Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 10 bzw. 2 Brutpaaren (3 Weibchen/2 Männchen). Signifikanzen nach Mann-Whitney U-Test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Sowohl die belasteten Weibchen als auch die belasteten Männchen zeigten im Kreuzungsexperiment einen Anstieg der durchschnittlichen Gelegegröße. Dieser Anstieg war bei den Paarungsgruppen aus belasteten Weibchen mit unbelasteten Männchen etwa 25 % höher als in bei den belasteten Männchen. Außerdem zeigten beide Paarungsgruppen eine erniedrigte Befruchtungsrate. Dabei war bei einer Paarung belasteter Weibchen mit unbelasteten Männchen nur nach Belastung mit 20 µg/L DHEA die Befruchtungsrate signifikant erniedrigt, während bei den belasteten Männchen bei beiden Konzentrationen ein signifikanter Rückgang der Befruchtungsrate zu beobachten war (Abb. 153).

7.2.8 Nachweis der Vitellogenin-mRNA-Induktion in der Leber männlicher Medakas nach lebenslanger kontinuierlicher Belastung mit DHEA

Bei den mit DHEA belasteten Medakamännchen konnten anhand der Messung der Vitellogenin-mRNA in der Leber keinerlei Unterschiede zu den Kontrollgruppen beobachtet werden.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 146: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle**, ♀: Die Oocyten waren von Primär (F I)- und Sekundärfollikeln (F II) umgeben, welche in der Peripherie angeordnet waren. 650 x

Abb. 147: Medaka (*Oryzias latipes*), **20 µg/L DHEA**, ♀: Bereits bei einer Belastung mit 20 µg/L DHEA war vereinzelt ein signifikanter Rückgang der Primär- und Sekundärfollikel (F II) zu beobachten. Im Zentrum des Ovars konnten atretische Oocyten (O) beobachtet werden. 700 x

Abb. 148: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle** ♂: Die Hoden der Kontrollmännchen waren von langgestreckter Gestalt und enthielten im Zentrum spermiengefüllte Bereiche. 500 x

Abb. 149: Medaka (*Oryzias latipes*), **100 µg/L DHEA**, ♂: Im Längsschnitt zeigte sich der Tubulus seminiferus als riesiger spermiengefüllter Hohlraum. Sp = Spermien, SC I = Primäre Spermatozyten, SC II = Sekundäre Spermatozyten, SG = Spermato gonien. 500 x

Abb. 150: Medaka (*Oryzias latipes*), **100 µg/L DHEA**, ♂: Testisova in starker Ausprägung. Die Oocyten unterscheiden sich deutlich von den Spermato gonien durch die sie umgebende Schicht von Follikelzellen. 750 x

7.3.9 Ultrastrukturelle Untersuchung der Leber des Medakas (*Oryzias latipes*) nach lebenslanger, kontinuierlicher Belastung mit DHEA

Die Befunde der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber der männlichen bzw. weiblichen Medakas (*Oryzias latipes*) sind in den Tabellen 23 und 24 aufgelistet und semiquantitativ bewertet.

Wasserkontrollen

Sowohl männliche als auch weibliche Kontrolltiere zeigten eine klare intrazelluläre Gliederung in das den Kern, rauhes endoplasmatisches Retikulum (rER) und Organellen enthaltende zentral gelegene Cytosplasma und peripher gelegene Speicherareale. Dabei waren bei den Weibchen die Glykogenspeicher merklich kleiner als bei den Männchen, während beide Geschlechter etwa über die gleiche Menge Lipid verfügten. Die Lipidtropfen waren in kleinen Feldern in den Glykogenspeichern lokalisiert und nicht in jedem Zellanschnitt zu finden.

Die Hepatocyten der Kontrollweibchen wiesen einen leicht unregelmäßigen Kernumriss auf. Die verhältnismäßig geringe Heterochromatinmenge war im wesentlichen um den prominenten Nucleolus und in der Kernperipherie lokalisiert.

Das leicht fragmentierte rER erstreckte sich in Form von Stapeln aus bis zu 22 parallelen Zisternen oft vom Zellkern bis in die Peripherie. Dilatierte Bereiche waren selten. Im rER verteilt lagen zahlreiche Mitochondrien und weniger häufig auch Peroxisomen, welche jedoch keine auffällige Assoziation mit den rER-Zisternen aufwiesen. Auch Lysosomen waren häufig anzutreffen. Die Gallencanaliculi waren regelmäßig mit einer myelinartigen Matrix angefüllt, jedoch waren Myelinwirbel im Cytoplasma selten (Abb. 155). Dictyosomen waren selten und wiesen nur geringe Aktivität auf.

Bei den männlichen Kontrolltieren besaßen die Zellkerne einen etwas unregelmäßigeren Umriss und einen weniger stark ausgeprägten Nucleolus. Das nur geringfügig fragmentierte rER war nur in geringen Mengen vorhanden und zeigte kaum Stapelbildung (Abb. 156).

Gegenüberliegende Seite

Abb. 155: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle, ♀**; Die Hepatocyten zeigen eine deutliche Trennung zwischen Cytoplasma und Glykogenspeichern. Das rER ist hier in Stapeln aus bis zu 15 teilweise leicht fragmentierten Zisternen organisiert. Der Golgi-Apparat zeigt eine verhältnismäßig geringe Aktivität. Ungewöhnlich sind bei dieser Zelle die eng mit der Kernmembran assoziierten Peroxisomen. 18.500 x

Abb. 156: Medaka (*Oryzias latipes*), **Wasserkontrolle, ♂**; Während die Hepatocyten der Männchen eine große Anzahl von relativ homogenen Mitochondrien und Peroxisomen aufweist, ist die rER-Menge gering. Auch die Dictyosomen zeigen nur geringe Aktivität. 9.200 x

Tab. 23: Semiquantitative Analyse der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber weiblicher Medakas (*Oryzias latipes*) nach Exposition gegenüber Dehydroepiandrosteron (DHEA)

		Wasser	DMSO	DHEA			
			0,01 %	100 ng/L	2 µg/L	20 µg/L	100 µg/L
Intrazelluläre Gliederung		+++	+++	++/+++	+++	++/+++	++
Parenchymheterogenität		+ / +++	++	++	+ / +++	++	+++
Kern	Regelmäßige Form	++	++	+ / +++	++	++/+++	++/+++
	Heterochromatin	++	++	++/+++	++	++/+++	+
	Nucleolus	++	+ / ++	++	++	++/+++	+
	Kondensierter Nucleolus	-	-	-	+	++	++
Mitochondrien	Menge	++	++	++	+ / +++	+ / +++	+ / +++
	Größe	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++
	Heterogenität	++	++	++/+++	++	++	++/+++
	Assoziation mit rER	+	+	+ / +++	++	++	+
	Intramitoch. Granula	++/-	±	-	-	-	-
Peroxisomen	Menge	+	++	+	+	++	+
	Größe	++	++	++	++	++	++
rER	Menge	+++	++/+++	++/+++	++/+++	+++ / ++++	++/+++
	Stapel	++/+++	++	++	+++	+++	+
	Paral. Zisternen	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Fragmentierung	+	+ / ++	++	+	+++	+++
	Dilatation	+	+	+ / +++	+	+ / ++	++/+++
sER	Menge	±	±	±	±	±	±
Golgi	Menge	+	+	+	++	+	+
	Zisternen	+	++	++	++	+	+
	Fenestrierung	+	+	+ / +++	+	++	++
	Aktivität	+	++	++	++/+++	+	+
Lysosomen	Menge absolut	++	++	++/+++	++	++/+++	++
	Primäre Lysosomen	+	+	+	+	+	+
	Sekundär Lysosomen	+	+	++	+	++	+ / ++
	Myelin	+	+	++	+	+	+
	Autophagosomen	-	±	±	-	-	±
	„Myelin“ i. Gallencanal.	++	+	+	+	+	+
Lipid	Menge	++	+	++	+	+	++
	Lipidfelder	+	++	++	-	+	+ / ++
Lokalisation im Glykogen		++	++	++	++	++	++
Glykogen	Menge	++	++	++	++	+	++
	Part. Entspeicherung	+	+	+	+	++	++/+++
Interzellularen	geschlossen	+++	++	+++	+++	+++	+++
Fremdzellen	Makrophagen	+	+	+	+	+	+

- Merkmal fehlt
 + selten
 ++ Merkmal deutlich ausgeprägt
 +++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt
 ++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden bzw. ausgeprägt

■ nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen
 □ leichter Unterschied zu den Kontrollen
 ■ deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

Tab. 24: Semiquantitative Analyse der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber männlicher Medakas (*Oryzias latipes*) nach Exposition gegenüber Dehydroepiandrosteron (DHEA).

		Wasser	DMSO	DHEA			
			0,01 %	100 ng/L	2 µg/L	20 µg/L	100 µg/L
Intrazelluläre Gliederung		+++	+++	+++	+++	+++	+++
Parenchymheterogenität		+	+	+/++	+	+	+
Kern	Regelmäßige Form	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Heterochromatin	++	++	+++	++	+++	++
	Kondensierter Nucleolus	-	-	±	-	+	+++
	Nucleolus	++	+/++	++	++	++	+
Mitochondrien	Menge	+++	+++	+++	+++	++	+++
	Größe	++	++	++	++	++	++
	Heterogenität	++	+++	+++	+++	+++	+++
	Intramitoch. Granula	-	±	-	-	++	-
	Assoziation mit dem rER	++	++	++	++	++	++
	Erweiterte Cristae	-	-	+	±	+	-
Peroxisomen	Menge	++	++	+++	+++	+++	+++
	Größe	+	+	++	++	+	++
rER	Menge	+	+	+/++	+/++	+	+
	Stapel	+	+/++	+/++	++	+	+
	Paral. Zisternen	++	+++	++	++	++	++
	Fragmentierung	+	+/++	+/++	+	++	++
	Dilatation	-	-	-	-	+	+
sER	Menge	+	+	+	+	+	+
Golgi	Menge	+	+/++	+/++	++	+	+
	Zisternen	+	+/++	+/++	+	+	+
	Fenestrierung	+	+/++	++	+	++	+
	Aktivität	+	+/++	++	+	+	+
Lysosomen	Menge absolut	++	++	+	++	++	++
	Primäre Lysosomen	+	+/++	+	+	++	++
	Sekundäre Lysosomen	+	±	-/+	+	+	+
	Myelin	++	+	+	+	+	-
	Vakuolen	+	+	+	+	+	+
	„Myelin“ in Gallencan.	+	+	+	+	+++/+	+
Lipid	Menge	++	+/++	+	+	+++	+/++
	Lipidfelder	+	-	-	-	±	+
	Lage im Glykogen	+	+	+	+	+	+
Glykogen	Menge	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Part. Entspeicherung	-	+/++	++/-	-	-	+++
Interzellularen	geschlossen	+++	+++	+++	+++	++	+++
Fremdzellen	Makrophagen	-	+	+/++	+	+	+++

- Merkmal fehlt

+ selten

++ Merkmal deutlich ausgeprägt

+++ Merkmal häufig bzw. sehr deutlich ausgeprägt

++++ Merkmal überdurchschnittlich vorhanden bzw. ausgeprägt

■ nicht auswertbar; zu großer Unterschied zwischen den einzelnen Individuen

□ leichter Unterschied zu den Kontrollen

■ deutlicher Unterschied zu den Kontrollen

Mitochondrien und Peroxisomen waren verhältnismäßig zahlreichen vorhanden. Die Mitochondrien waren oftmals von einer einzelnen rER-Zisterne umgeben und wiesen damit eine deutliche Assoziation mit dem rER auf. Lysosomen sowie Myelinwirbel kamen regelmäßig vor. Wie bereits bei den Weibchen war die Menge der Dictyosomen gering. Sie bestanden aus maximal 2 Zisternen und zeigten kaum Aktivität.

Lösungsmittelkontrolle (0,01 % DMSO)

Bei den mit 0,01% DMSO belasteten Medakas konnten nur geringfügige Veränderungen gegenüber der Wasserkontrolle festgestellt werden. Bei beiden Geschlechtern konnte eine Abnahme der Lipidmenge beobachtet werden. Dagegen war eine Abnahme der Glykogenmenge sowie eine leichte Entspeicherung der Glykogenareale nur bei den Männchen festzustellen. Die Dictyosomen zeigten sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen eine leichte Proliferation und Aktivitätszunahme.

Bei den Weibchen erschien durch das vereinzelte Auftreten von Autophagosomen das Parenchym etwas heterogener. Während die rER-Menge insgesamt etwas abnahm, erhöhte sich der Fragmentierungsgrad einzelner rER-Zisternen leicht. Die Interzellularen waren in manchen Bereichen des Leberparenchyms etwas erweitert.

Bei den Männchen fiel eine verstärkte Organisation des rER in Form von parallelen Zisternen und Stapeln auf, ohne dass eine auffällige Mengenzunahme des rER stattgefunden hätte. Die Mitochondrienmenge war etwas geringer als bei den Wasserkontrollen, jedoch wiesen die Mitochondrien eine etwas heterogene Form auf. Außerdem konnten vereinzelt intramitochondriale Granula beobachtet werden.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 157: Medaka (*Oryzias latipes*), **DMSO-Kontrolle, ♀**; Die rER-Menge nimmt insgesamt etwas ab, statt dessen erhöht sich der Fragmentierungsgrad einzelner rER-Zisternen leicht. 12.000 x

Abb. 158: Medaka (*Oryzias latipes*), **DMSO-Kontrolle, ♀**; Die Dictyosomen zeigen eine leichte Zunahme der Zisternenmenge sowie eine Aktivitätssteigerung. 21.000 x

Abb. 159: Medaka (*Oryzias latipes*), **DMSO-Kontrolle, ♂**; Das rER tritt stärker in Stapeln auf, ohne dass eine auffällige Mengenzunahme des rER stattfindet. Die Mitochondrienmenge ist gegenüber den Wasserkontrollen etwas verringert. 9.000 x

Abb. 160: Medaka (*Oryzias latipes*), **DMSO-Kontrolle, ♂**; Die Dictyosomen bestehen aus bis zu vier, leicht fragmentierten Zisternen. Die Aktivität ist gegenüber den Wasserkontrollen leicht erhöht. 28.500 x

100 ng/L DHEA

Die Ultrastruktur der Hepatocyten der mit 100 ng/L DHEA belasteten Weibchen war insgesamt etwas heterogener. Neben ovalen und runden Mitochondrienanschnitten konnten auch langgestreckte und verzweigte Formen gefunden werden. Das rER war insgesamt ebenfalls sehr uneinheitlich. Die rER-Zisternen lagen zwar weiterhin in parallelen Stapeln, jedoch wiesen sie eine deutliche Fragmentierung und Dilatation auf (Abb. 161). Die Dictyosomen bestanden aus maximal drei deutlich fragmentierten parallelen Zisternen und wiesen häufig eine stark ausgeprägte Aktivität auf. Lysosomale Elemente waren häufig. Gelegentlich waren Autophagosomen (Abb. 162) zu beobachten.

Auch bei den Männchen war die Parenchymheterogenität durch das verstärkte Auftreten von Makrophagen und leicht erweiterten Interzellularen etwas erhöht (Abb. 163). Der Nucleolus vieler Zellen war sehr dunkel und wirkte kondensiert. Die Mitochondrien waren sehr heterogen und wiesen kurze ungeordnete Cristae auf, welche leicht dilatiert erschienen (Abb. 164). Die Dictyosomen waren durch eine verstärkte Fragmentierung der Zisternen sowie durch einen leichten Anstieg der Aktivität gekennzeichnet. Die Lipidspeicher gingen deutlich zurück. Sie waren nur noch in Form kleiner, in Feldern organisierter Tröpfchen vorhanden.

2 µg/L DHEA

Die Hepatocyten der Medakaweibchen machten bei dieser Konzentration einen sehr geordneten Eindruck. Das rER lag in wohlgeordneten Stapeln vor allem in der Zellperipherie. Dabei wiesen die rER-Zisternen kaum fragmentierte oder dilatierte Bereiche auf. Die dichten Glykogenspeicher waren deutlich vom Cytoplasma abgegrenzt (Abb. 165), Lipidspeicher waren kaum vorhanden.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 161: Medaka (*Oryzias latipes*), **100 ng/L DHEA**, ♀; Die rER-Zisternen weisen eine deutliche Fragmentierung und Dilatation auf. Die Dictyosomen bestehen aus maximal drei deutlich fragmentierten parallelen Zisternen und zeigen eine ausgeprägte Aktivität. 5.500 x

Abb. 162: Medaka (*Oryzias latipes*), **100 ng/L DHEA**, ♀; Autophagosom mit ausgeprägten Lysosomen. Eine klare intrazelluläre Gliederung ist nicht vorhanden. 21.000 x

Abb. 163: Medaka (*Oryzias latipes*), **100 ng/L DHEA**, ♂; Die Parenchymheterogenität ist durch das verstärkte Auftreten von Makrophagen und leicht erweiterten Interzellularen leicht erhöht. 5.400 x

Abb. 164: Medaka (*Oryzias latipes*), **100 ng/L DHEA**, ♂; Der Nucleolus wirkt kondensiert. Die heterogenen Mitochondrien weisen kurze ungeordnete Cristae auf, welche leicht dilatiert erscheinen. Die Dictyosomen sind etwas fragmentiert und die Aktivität ist leicht erhöht. Die Lipidspeicher sind nur noch in Form kleiner in Feldern organisierter Tröpfchen vorhanden. 8.500 x

Die Mitochondrienmenge war gegenüber den Wasserkontrollen etwas verringert, eine Assoziation mit dem rER war augenfällig. Die Dictyosomenmenge war etwas erhöht, die Golgifelder bestanden aus bis zu fünf leicht fragmentierten Zisternen und zeigten eine deutliche Aktivitätszunahme.

Die Hepatocyten der männlichen Medakas zeigten aufgrund der sehr unregelmäßigen Glykogenspeicher eine leichte Abnahme der intrazellulären Gliederung. Wie bereits bei den Weibchen war auch hier ein deutliche Abnahme der Lipidmenge zu beobachten (Abb. 166). Auch die mit 2 µg/L DHEA belasteten Männchen zeigten sowohl eine Zunahme der Mitochondrienheterogenität als auch das Auftreten erweiterter Cristae. Das rER war in Stapeln von bis zu 7 parallelen Zisternen anzutreffen. Die Dictyosomenmenge war erhöht.

20 µg/L DHEA

Bei einer Belastung mit 20 µg/L DHEA konnte erstmals eine leichte Kondensation des Nucleolus bei den Weibchen beobachtet werden (Abb. 167). Der Zellkern verfügte über einen mehr oder weniger regelmäßigen Umriss. Darüber hinaus zeigten die Hepatocyten häufig glykogenhaltige stark kondensierte Bereiche (Glykogenosomen).

Gegenüberliegende Seite

Abb. 165: Medaka (*Oryzias latipes*), **2 µg/L DHEA**, ♀; Die Hepatocyten zeigen eine klare intrazelluläre Gliederung. Die rER-Zisternen weisen kaum fragmentierte oder dilatierte Bereiche auf. Lipidspeicher sind selten. Die Mitochondrienmenge ist gegenüber den Wasserkontrollen etwas verringert, eine Assoziation mit dem rER ist augenfällig vorhanden. Die Dictyosomenmenge ist ebenso wie die Aktivität etwas erhöht. 7.100 x

Abb. 166: Medaka (*Oryzias latipes*), **2 µg/L DHEA**, ♂; Die Mitochondrienheterogenität nimmt zu. Außerdem ist das Auftreten erweiterter Cristae zu beobachten. Das rER liegt in Stapeln von bis zu 7 parallelen Zisternen überwiegend im perinucleären Raum. Die Menge der Dictyosomen ist erhöht. 7.000 x

Abb. 167: Medaka (*Oryzias latipes*), **20 µg/L DHEA**, ♀; Der Zellkern verfügt über regelmäßigen Umriss und einen leicht kondensierten Nucleolus. Darüber hinaus sind häufig glykogenhaltige stark kondensierte Bereiche zu beobachten (Pfeile). Die rER-Menge ist mit der Lösungsmittelkontrolle vergleichbar, die Zisternen weisen jedoch eine starke Fragmentierung sowie einige dilatierte Bereiche auf. Lipid- und Glykogenmenge ist verringert. Die Glykogenspeicher sind teilweise entspeichert. 9.000 x

Abb. 168: Medaka (*Oryzias latipes*), **20 µg/L DHEA**, ♂; Die Heterochromatinmenge nimmt leicht zu, außerdem ist eine beginnende Kondensation des Nucleolus zu beobachten. Die Mitochondrienmenge ist gegenüber den Wasserkontrollen klar verringert, die Heterogenität der Mitochondrien nimmt dagegen zu. Intramitochondriale Granula sowie erweiterte Cristae kommen regelmäßig vor. Die Zisternen des rER sowie des Golgi-Apparates weisen eine verstärkte Fragmentierung auf. Außerdem sind die rER-Zisternen teilweise dilatiert. 9.200 x

Die rER-Menge war, wie auch schon bei einer Belastung mit 100 ng/L DHEA, mit der Lösungsmittelkontrolle vergleichbar; die Zisternen waren jedoch wesentlich stärker fragmentiert und wiesen außerdem einige dilatierte Bereiche auf. Der Golgi-Apparat war mit der Wasserkontrolle vergleichbar, jedoch zeigten die Zisternen häufiger eine deutliche Fragmentierung. Lipid- und Glykogenmenge waren verringert. Außerdem wiesen die Glykogenspeicher häufig eine partielle Entspeicherung auf. Bei den männlichen Hepatocyten zeigte der Zellkern eine leichte Zunahme der Heterochromatinmenge sowie eine beginnende Kondensation des Nucleolus (Abb. 168). Die Mitochondrienmenge war gegenüber den Wasserkontrollen klar verringert, die Heterogenität der Mitochondrien nahm dagegen zu. Intramitochondriale Granula sowie erweiterte Cristae kamen regelmäßig vor. Die Zisternen des rER sowie des Golgi-Apparates wiesen eine verstärkte Fragmentierung auf. Dazu waren die rER-Zisternen teilweise dilatiert.

100 µg/L DHEA

Während die durch eine Belastung mit DHEA hervorgerufenen Modifikationen bisher als weitgehend adaptiv zu bezeichnen waren, konnten bei einer Exposition gegenüber 100 µg/L DHEA zwar nur wenige, jedoch als pathologisch zu wertende Veränderungen beobachtet werden.

Die Kerne weiblicher Hepatocyten besaßen einen regelmäßigen Umriss und auffällig wenig Heterochromatin. Der Nucleolus war deutlich kondensiert (Abb. 169). Die Mitochondrienmenge war klar verringert, dagegen nahm die Heterogenität zu. Die rER-Zisternen zeigten eine oftmals schwerwiegende Dilatation und starke Fragmentierung. Auch die Zisternen des Golgi-Apparates waren häufig fenestriert und leicht dilatiert.

Auch die Zellkerne der männlichen Versuchstiere wiesen einen stark kondensierten Nucleolus auf. Die auffälligste Veränderung stellte jedoch die starke Proliferation der Peroxisomen dar (Abb. 170). Dabei übertraf die Peroxisomenmenge die der Mitochondrien um etwa $\frac{1}{3}$.

Gegenüberliegende Seite

Abb. 169: Medaka (*Oryzias latipes*), 100 µg/L DHEA, ♀; Die Kerne weiblicher Hepatocyten verfügen über auffällig wenig Heterochromatin und einen deutlich kondensierten Nucleolus. Die Mitochondrienmenge ist verringert, dagegen nimmt die Heterogenität zu. Die rER-Zisternen zeigen eine oftmals schwerwiegende Dilatation und starke Fragmentierung. Auch die Zisternen des Golgi-Apparates waren häufig fenestriert und leicht dilatiert. 15.000 x

Abb. 170: Medaka (*Oryzias latipes*), 100 µg/L DHEA, ♂; Auch die Zellkerne der männlichen Versuchstiere weisen einen stark kondensierten Nucleolus auf. Die auffälligste Veränderung stellte jedoch die starke Proliferation der Peroxisomen dar. Die Peroxisomenmenge übersteigt dabei die der Mitochondrien um etwa $\frac{1}{3}$. 21.000 x

7.3 Diskussion

Im Zuge der chronischen Belastung des Medakas mit Dehydroepiandrosteron (DHEA) konnte eine Vielzahl unterschiedlicher Veränderungen beobachtet werden. Das Fehlen eines signifikanten Unterschieds in der Gesamtmortalität der F₁- und F₂-Generation zeigt das geringe toxische Potential von DHEA auf frühe Entwicklungsstadien des Medakas. Die ungewöhnlich hohe Mortalität bei einer Belastung mit 100 ng/L ist dabei wohl eher auf eine DHEA-unabhängige Kontamination der Eier mit Mikroorganismen zurückzuführen.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine DHEA-Belastung negativ mit dem Wachstum, insbesondere mit dem Gewicht korreliert ist (Gordon et al. 1987, McIntosh et al. 1993). Deswegen wird die Substanz auch als Mittel gegen Fettleibigkeit (Adipositas) verwendet (Bernadier et al. 1993, Cleary 1990). Auch bei Regenbogenforellen konnte ein verringertes Körpergewicht nach oraler Administration von DHEA beobachtet werden (Orner et al. 1995, 1998). Im vorliegenden Experiment war eine signifikante Verringerung des Wachstums allerdings erst bei einer Belastung mit 100 µg/L DHEA festzustellen. Das tatsächliche Gewicht der Weibchen ab Konzentrationen ≥ 2 µg/L DHEA sind durch die beobachtete Hypertrophie der Ovarien maskiert und wäre wahrscheinlich ohne die Veränderungen in den Ovarien wesentlich niedriger als das gemessene. Im Gegensatz dazu scheint DHEA auf das Wachstum und die Gewichtszunahme des Medakas bis zu einer Konzentration von 20 µg/L eher eine fördernde Wirkung zu besitzen.

Die Exposition gegenüber DHEA verursachte eine deutliche Vermännlichung der Testfische. Dies erscheint nicht weiter verwunderlich, da es sich bei DHEA um eine Vorstufe von Testosteron handelt und diese Substanz auch in der Literatur als schwaches Androgen gewertet wird (Dehennin et al. 1998). Paradox wird dieses Ergebnis jedoch durch den Umstand, dass bei Regenbogenforellen nach DHEA-Gabe der Vitellogeningehalt im Plasma anstieg (Orner et al. 1996, Shilling et al. 1999), was auf eine Verweiblichung hindeuten würde. Eine solche Vitellogenininduktion konnte beim Medaka jedoch nicht nachgewiesen werden, da bei den männlichen Versuchsfischen kein Anstieg des Vitellogenin-mRNA-Gehalts in der Leber beobachtet werden konnte. Die Annahme einer androgenen Wirkung von DHEA auf den Medaka findet ein weiteres Argument in der starken Hypertrophie des Hodens, sowie der erhöhten Spermienproduktion. Da die Spermienproduktion und -reifung durch Testosteron und FSH (=Follikelstimulierendes Hormon)-aktiviert wird (Geneser 1990), würde ein erhöhter Testosteronspiegel in einer erhöhten Spermienproduktion resultieren. Den Hinweisen auf eine androgene Wirkung von DHEA steht die Zunahme der durchschnittlichen und maximalen Gelegegröße bei den Weibchen sowie die Abnahme des Befruchtungserfolgs gegenüber.

Im Rahmen der Kreuzungsexperimente konnte gezeigt werden, dass sowohl die Paarungsgruppe mit belasteten Männchen wie auch jene mit belasteten Weibchen einen signifikanten Anstieg der Gelegegröße gegenüber der DMSO-Kontrolle zeigten. Allerdings war die Gelegegröße der Kreuzungsgruppen aus belasteten Männchen und unbelasteten Weibchen deutlich kleiner als bei der Gruppe aus belasteten Weibchen und unbelasteten Männchen. Eine Erklärung für den Anstieg der Gelegegröße bei den belasteten Männchen kann eigentlich nur in einer gesteigerten sexuellen Aktivität der Männchen liegen, welche einen entscheidenden Einfluß auf die Laichstimulation der Weibchen hat (Scholz & Gut-

zeit 2000). Im Gegensatz dazu scheint die DHEA-Belastung bei weiblichen Medakas tatsächlich eine proliferatorische Wirkung auszuüben. In Untersuchungen bei Säugern konnten zwar keine Hypertrophie der Ovarien beobachtet werden, jedoch traten regelmäßig atretische Follikel (Familiari et al. 1985, Lee et al. 1991) sowie Störungen des Menstruationszyklus auf, welche in manchen Fällen zu einer verminderten Fruchtbarkeit oder zur Unfruchtbarkeit führte (Gotz et al. 1983, Kowalcki & Chatterton 1992). Diese Beobachtung stimmt mit den vorliegenden Ergebnissen überein, da bei den belasteten Weibchen sich bei einer Exposition gegenüber 20 µg/L DHEA eine signifikante Abnahme der Befruchtungsrate zeigte, was wahrscheinlich einem Rückgang der Eiqualität zurückzuführen ist. Darüber hinaus konnten Kowalcki & Chatterton (1992) beim Menschen einen erhöhten FSH Serumgehalt unter Belastung mit DHEA beobachten, während der Serumgehalt an LH (Luteinisierendes Hormon) zurückging. FSH stimuliert und reguliert die Reifung der Eifollikel, was, diesen Effekt beim Medaka unter Belastung mit DHEA vorausgesetzt, ein Grund für den bis zu einer Belastung mit 20 µg/L DHEA auftretenden Anstieg der Gelegegröße erklären könnte.

Bei den belasteten Männchen war ab einer Konzentration von 2 µg/L DHEA ein signifikanter Rückgang des Befruchtungserfolges zu verzeichnen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Männchen trotz einer gesteigerten Spermienproduktion weniger erfolgreich bei der Eibefruchtung waren als die Kontrollgruppen. Dies kann möglicherweise als Ausdruck eines gesteigerten aggressiven Sexualverhaltens sein, welches insbesondere bei den mit 100 µg/L DHEA belasteten Männchen beobachtet werden konnte.

Anhand der ultrastrukturellen Untersuchung der gegenüber DHEA exponierten Medakas konnten keinerlei Korrelationen zu den Untersuchungen von Orner et al. (1996) an Regenbogenforellen hergestellt werden. Eine Zunahme des rER, bei Orner et al. (1996) als Zeichen einer Induktion der Vitellogenese gesehen, konnte in der vorliegenden Untersuchung nur bei den mit 20 µg/L DHEA belasteten Medakaweibchen beobachtet werden. Auffällig war dagegen bei beiden Geschlechtern die dosisabhängige Fragmentierung und Dilatation der rER-Zisternen, welche bei den Weibchen gleichzeitig mit einer Abnahme der Dictyosomenaktivität und einer verstärkten Fenestrierung der Golgi-Zisternen auftrat. Diese Veränderungen können zusammen als Hinweis auf eine Störung des Vesikeltransfers zwischen rER und Golgi-Apparat gewertet werden, bei dem die vom rER gebildeten Proteine durch die Dictyosomen nicht mehr aufgenommen und weiterverarbeitet werden können (Ghadialli 1982). Die verstärkte Heterogenität der Mitochondrien weist auf einen erhöhten Energiebedarf der Zellen hin, welche durch die Vergrößerung der aktiven Membranfläche kompensiert wird (Braunbeck 1991). Bei den Weibchen war zusätzlich ein leichter Rückgang der Mitochondrienmenge zu beobachten. Da die Fusion von rER-Vesikeln und Golgi-Zisternen ein ATP verbrauchender Prozess ist, wäre es auch möglich, dass diese Energie aufgrund der Veränderungen an den Mitochondrien nicht mehr bereitgestellt werden kann (Braunbeck et al. 1992). Die starke Kondensation der Nucleoli weist auf eine schwerwiegende Inaktivierung der rRNA hin und steht somit in unmittelbarem Zusammenhang mit einer Reduktion der Proteinbiosynthese (Nagel 1980, Ghadialli 1982). Die Veränderungen in der Leber weiblicher Medakas nach Exposition gegenüber DHEA könnten eine Erklärung für eine Verringerung der Befruchtungsrate aufgrund einer verringerten Eiqualität geben. Die Inaktivierung der Proteinsynthese in der Leber lässt u. a. auf eine verringerte Vitellogeninproduktion und damit auf eine schlechtere Versorgung der Eier mit Dotterstoffen schließen (Braunbeck 1992).

Während bei den Weibchen die Menge der Peroxisomen gegenüber den Kontrollen unverändert blieb, konnte bei den Männchen eine dosisabhängige Zunahme der Peroxisomenmenge beobachtet werden. Wie bereits erwähnt, wird eine DHEA-Belastung in vielen Säugetierstudien mit einer Peroxisomenproliferation in Zusammenhang gebracht (Bellei et al. 1992, Gonzalez 1997, Rao et al. 1992, Waxman 1996). Dagegen konnte bei Regenbogenforellen nach oraler Administration von DHEA keine Zunahme der Peroxisomenmenge beobachtet werden (Orner et al. 1995, 1998). Hier zeigt sich deutlich, dass unterschiedliche Fischarten offensichtlich sehr unterschiedlich auf eine Belastung mit DHEA reagieren. Der Grund dafür, dass eine Peroxisomenproliferation nur bei den Männchen beobachtet werden konnte, könnte in der durch das Enzym 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) vermittelten Gleichgewichtsreaktion zwischen DHEA und Testosteron begründet liegen. Da bei den Weibchen über die Aromataseaktivität stets Testosteron weiterverarbeitet wird, liegt das Gleichgewicht ganz auf der Seite des Testosterons. Anders bei den Männchen, bei denen Testosteron in der Regel nicht weiter metabolisiert wird, woraus möglicherweise ein erhöhter DHEA-Spiegel resultiert.

Die Untersuchung der Wirkungen von DHEA auf den Medaka in Rahmen eines Life Cycle-Experiments haben eine Vielzahl reproduktionsrelevanter sowie cytologischer Beeinträchtigungen gezeigt. Es gibt viele Hinweise, dass gerade diese Steroidvorstufe in unterschiedlichen Organismen ganz verschiedene Effekte bewirkt. Insgesamt scheinen die in der vorliegenden Studie verursachten Effekte aus einem durch DHEA verursachten starken Ungleichgewicht der einzelnen Hormone zueinander zu resultieren, welches sich in vielerlei reproduktionsrelevanten Veränderungen manifestiert und somit die potentielle Gefährdung der aquatischen Umwelt durch eine Belastung mit DHEA demonstriert.

8. Abschlussdiskussion

8.1 Vergleich der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber nach Belastung mit Nonylphenol bei unterschiedlichen Fischarten

Tab. 25: Veränderungen in der Ultrastruktur der Leber nach Belastung mit Nonylphenol bei drei unterschiedlichen Fischarten. Angaben als geringste Konzentration ($\mu\text{g/L}$), bei der das Merkmal zum ersten Mal auftrat.

	Forellen				Medaka Adult		Karpfen juvenil
	Juvenil		Adult		♂	♀	*
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
Intrazelluläre Gliederung	10		10		50		
Parenchymheterogenität	10	≥ 10	10		50	≥ 2	15
Heterochromatin			10		≥ 2	20	
Menge Mitochondrien	10		10				≥ 2
Heterogenität Mitochondrien	≥ 1		10	≥ 1	≥ 2	≥ 2	15
Erweiterte Cristae					≥ 2		
Menge Peroxisomen	≥ 1	10					
Menge rER	≥ 1		≥ 1		≥ 2		≥ 1
Stapel rER	10		≥ 1		≥ 2		≥ 10
Paral. Zisternen			≥ 1		≥ 2		≥ 10
Fragmentierung	≥ 1		10		≥ 2	≥ 20	15
Dilatation			≥ 1	10			15
Menge sER			10		50		15
Anzahl der Dictyosomen	≥ 1		≥ 1				≥ 1
Zisternen	10		≥ 1				≥ 1
Fenestrierung	10		≥ 1				≥ 10
Aktivität Golgi-Apparat	≥ 1	10	10	≥ 1	50		≥ 1
Menge Lysosomen	≥ 1		10	≥ 1			
Autophagosomen	10		10	10			
Vakuolen			≥ 1	10	≥ 2		
Menge Lipid							≥ 20
Lage im Glykogen							≥ 20
Menge Glykogen			≥ 1	≥ 1			≥ 10
Part. Entspeicherung	≥ 1		10	≥ 1	50		
Makrophagen	10				≥ 20		≥ 1

* keine Differenzierung nach Geschlecht möglich

- Zunahme, verstärkte Ausprägung des Merkmals
 Abnahme, weniger starke Ausprägung des Merkmals

Artspezifische Reaktionen auf Schadstoffbelastung fanden auf cytologischer Ebene bisher nur in wenigen Untersuchungen Beachtung (Arnold et al. 1995, Arnold & Braunbeck 1993, Braunbeck 1994, Braunbeck et al. 1990c, 1992a.). Dabei legt die Heterogenität der Fischarten untereinander die Vermutung nahe, dass verschiedene Fischarten unterschiedlich auf eine Belastung mit Xenoöstrogenen reagieren (Monteverdi & Di Giulio 1999). Braunbeck et al. (1992) zeigten, dass ein wesentliches

Merkmal der Reaktion von Hepatocyten auf die Einwirkung toxischer Chemikalien neben der Geschlechtsspezifität (Braunbeck et al. 1989) die Artspezifität ist, die sich sowohl qualitativ in cytopathologischen Merkmalen als auch quantitativ in der Empfindlichkeit der Reaktion äußert. Darüber hinaus ist die Reaktion auf Schadstoffe auch von Faktoren wie Alter, Stand im Laichzyklus, Temperatur, und Ernährungszustand abhängig (Braunbeck 1992, Cough 1975, Hellowell 1986, Mantovani et al. 1999, Sprague 1985, Storch et al. 1984a, b).

Aufgrund dieser Annahmen erscheint ein Artvergleich der Reaktion auf Nonylphenol und 17α -Ethinylestradiol sinnvoll für eine Abschätzung des Gefährdungspotentials dieser Substanzen.

Eine Belastung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Nonylphenol resultierte in zahlreichen ultrastrukturellen Veränderungen der Leber der untersuchten Fischarten (Tab. 25). Es fällt auf, dass beide Geschlechter einer Versuchsgruppe, wenn nach Geschlecht differenziert werden konnte, in ihrer Reaktion einheitlicher waren als die Versuchsgruppen untereinander. Ein Vergleich der juvenilen und adulten Forellen machte deutlich, dass die adulten Forellen mit wesentlich mehr veränderten Merkmalen auf eine Exposition gegenüber Nonylphenol reagierten als die Juvenilen. Auch im Vergleich zwischen Männchen und Weibchen zeigten die adulten Forellen die größten Unterschiede, da bei den Weibchen wesentlich mehr unspezifische Veränderungen zu beobachten waren als bei den Männchen.

Die einheitlichste Veränderung war bei allen Versuchsgruppen eine Proliferation des Proteinsyntheseapparats. Eine Mengenzunahme des rER sowie eine stärkere Organisation in parallelen Zisternen war in allen Gruppen ebenso zu beobachten wie eine Zunahme der Dictyosomenaktivität. Diese Veränderungen werden in zahlreichen Untersuchungen als Zeichen einer Induktion der Vitellogenese gewertet (Bun Ng et al. 1984, Herman & Kinclaid 1988, Peute et al. 1978, 1985, Pipan et al. 1990). Diese Veränderungen zusammen mit der bei fast allen Versuchsgruppen auftretenden Zunahme der Mitochondrienheterogenität als Maßnahme zur Vergrößerung der Membranfläche zur Energiegewinnung können als adaptive Prozesse einer erhöhten Proteinsynthese gewertet werden. Im Gegensatz dazu war die bei den adulten Forellen und den juvenilen Karpfen beobachtete Dilatation der rER-Zisternen als degeneratives Merkmal zu betrachten.

Eine weitere artspezifische Auffälligkeit war die Beobachtung, dass bei männlichen und weiblichen Medakas außer einer Aktivitätszunahme keine Veränderungen an den Dictyosomen stattfanden. Auch sonst erwies sich der Medaka in vielerlei Hinsicht als die Fischart, welche von einer Exposition gegenüber Nonylphenol bezüglich der ultrastrukturellen Veränderungen am wenigsten betroffen war. Eine Abstufung der artspezifischen Empfindlichkeit auf die Exposition gegenüber Nonylphenol anhand der Ergebnisse zeigte, dass adulte laichbereite Forellen am stärksten von einer Exposition gegenüber Nonylphenol betroffen waren, gefolgt von den juvenilen Forellen und den juvenilen Karpfen, während der Medaka am unempfindlichsten reagierte. Ein Grund für die relative Unempfindlichkeit des Medakas könnte seine höhere metabolische Kapazität aufgrund seiner Haltung im Warmwasser sein.

8.2 Cytopathologischen Veränderungen nach Belastung mit Östrogenen bei unterschiedlichen Fischarten

Im Gegensatz zu einer Belastung mit Nonylphenol traten die durch Ethinylestradiol (EE2) induzierten Veränderungen am stärksten bei den adulten Forellenmännchen auf. Insgesamt sind die durch EE2 verursachten Effekte im Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wesentlich uneinheitlicher. Als Veränderungen im Proteinsyntheseapparat konnte in allen Gruppen eine Zunahme der dilatierten rER-Zisternen sowie eine Zunahme der Dictyosomenmenge und der Aktivität des Golgi-Apparates beobachtet werden. Anhand der übrigen Veränderungen ergab sich kein einheitliches Bild einer endokrinen Belastung. In der Literatur werden neben einer Proliferation des rER und Golgi-Apparates ein Rückgang der Glykogenspeicher sowie eine verstärkte Lipidansammlung in den Hepatocysten als Folge einer endokrinen Belastung bzw. einer einsetzenden Vitellogenese in der Leber genannt (Bun Ng et al. 1984, Herman & Kinclaid 1988, Nicolls 1968, Peute et al. 1978, 1985, Weiss 1972). Diese Veränderungen konnten in keiner der Versuchsgruppen beobachtet werden.

8.3 Vergleich der Ultrastruktur der Leber des Medakas (*Oryzias latipes*) nach Exposition gegenüber Nonylphenol bzw. Octylphenol

Ein Vergleich zwischen einer Belastung mit Octylphenol und Nonylphenol zeigte wie auch schon bei den Versuchen mit Forellen und Karpfen ein einheitlicheres Bild innerhalb einer Expositionsgruppe als zwischen den beiden Schadstoffen. Beiden Versuchsgruppen gemein war eine Zunahme der rER-Menge sowie eine Aktivitätssteigerung des Golgi-Apparats. Diese Veränderung konnte auch bei weiblichen Zebraäbrblingen während des Laichzyklus beobachtet werden (Peute et al. 1978) und stellt nach Munn (1974) einen Hinweis auf eine veränderte metabolische Aktivität aufgrund der Induktion der Vitellogenese dar. Ein ausschließlich bei Octylphenol zu beobachtender Effekt war die leichte Zunahme der sER-Menge. Eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Reticulums signalisiert eine Induktion von Biotransformations- bzw. Detoxifikationsprozessen (Braunbeck et al. 1989, 1990a, Hacking et al. 1978, Hinton et al. 1978, Klauning et al. 1979) und läßt auf eine leicht toxische Wirkung von Octylphenol schließen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann Octylphenol im Vergleich zu Nonylphenol als das Alkylphenol mit der höheren endokrinen Potenz (stärkere Effekte im Proteinsyntheseapparat) sowie als die Substanz mit dem höheren toxischen Potential angesehen werden. Dieses Ergebnis findet seine Entsprechung in zahlreichen Untersuchungen, in denen Octylphenol unter den Alkylphenolen als der potenteste Vertreter der Alkylphenole angesehen wird (Gray et al. 1997, Gronen et al. 1999, Jobling et al. 1996, White et al. 1994). Als Grund für die höhere östrogene Potenz von Octylphenol sehen Raychoudhury et al. (1999) den Umstand, das Octylphenol nur aus einem Gemisch von 2 Isomeren besteht, während es beim Nonylphenol 22 Isomere mit unterschiedlichem östrogenem Potential sind (Wheeler et al. 1997).

Tab. 26: Semiquantitative Analyse der ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber männlicher und weiblicher Medakas (*Oryzias latipes*, F₁) nach Exposition gegenüber Octylphenol bzw. Nonylphenol. Werte als niedrigste Effektkonzentration.

		Weibchen		Männchen	
		Octylphenol	Nonylphenol	Octylphenol	Nonylphenol
Intrazelluläre Gliederung				≥ 2	50
Parenchymheterogenität			≥ 2	≥ 2	50
Zellkern	Regelmäßige Kernform		50		50
	Zentrale Lage Kern	≥ 20		≥ 20	
	Heterochromatin				≥ 2
	Größe Nucleolus				50
Mitochondrien	Erweiterte Cristae			≥ 20	≥ 2
	Heterogenität	≥ 2			≥ 2
	Intramitoch. Granula	≥ 2			
Peroxisomen	Größe		50	50	
rER	Menge		≥ 2		≥ 2
	Stapel		≥ 2		≥ 2
	Paral. Zisternen		≥ 2		≥ 2
	Fragmentierung	50	≥ 20	50	≥ 2
	Dilatation			≥ 2	
sER	Menge	50		≥ 2	50
Golgi	Menge	≥ 20		50	
	Zisternen			50	
	Fenestrierung			50	
	Aktivität		50	≥ 2	50
	Myelin				≥ 20
	„Myelin“ in Gallencan.	50	≥ 2	50	
Lipid	Menge		≥ 20		
	Lage im Glykogen		≥ 20	50	≥ 2
Glykogen	Menge			≥ 2	
	Part. Entspeicherung			50	
Interzellularen Geschlossen				≥ 2	
Fremdzellen	Makrophagen			≥ 2	

☐ Zunahme, verstärkte Ausprägung des Merkmals

■ Abnahme, weniger starke Ausprägung des Merkmals

8.4 Vergleich der Veränderungen beim Medaka (*Oryzias latipes*) nach Exposition gegenüber Nonylphenol, Octylphenol, Dehydroepiandrosteron (DHEA) bzw. 17β-Estradiol im Life Cycle-Experiment

Ein Vergleich der reproduktionsrelevanten Parameter zwischen den einzelnen Life Cycle-Experimenten stellt eine gute Möglichkeit zur Abschätzung populationsrelevanter Einschränkungen durch die gewählten Substanzen dar.

Anhand eines direkten Vergleichs der gegenüber Octylphenol und Nonylphenol exponierten Medakas war eine deutliche Zunahme der Larvalmortalität in der F₁- und F₂-Generation zu beobachten, welche

bei Belastung mit Octylphenol jedoch wesentlich früher auftrat (Tab. 27). Ebenso verhielt es sich mit der Befruchtungsrate. Andere Parameter, wie die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses und das Auftreten von Zwittergonaden, waren bei beiden Substanzen durchaus vergleichbar. Insgesamt konnte anhand der vorliegenden Daten gezeigt werden, dass der Medaka auf Octylphenol etwa um den Faktor 10 empfindlicher reagierte als auf Nonylphenol. Die Veränderungen der Positivkontrolle mit 100 ng/L 17 β -Estradiol entsprachen den durch die Belastung mit Alkylphenolen hervorgerufenen, zeigten jedoch in den meisten Fällen eine stärkere Ausprägung.

Tab. 27: Vergleich der Veränderungen nach Exposition gegenüber Nonylphenol, Octylphenol, DHEA und 17 β -Estradiol beim Medaka im Life Cycle-Experiment.

	Nonylphenol	Octylphenol	DHEA	17 β -Estradiol
Test-Konzentrationen ($\mu\text{g/L}$)	0, 2, 20, 50	0, 2, 20, 50	0, 0,1, 2, 20, 100	0,1
Generationen unter Belastung	F ₁ , F ₂ , teilweise F ₃	F ₁ , teilweise F ₂	F ₁ , teilweise F ₂	F ₁ , F ₂ , teilweise F ₃
Embryonal- und Larvalphase (F₁)				
Erhöhte Sterblichkeit	50	2	2	+
Teratogenität (Skoliosen, Ödeme, etc.)	50	2	-	+
Laichblockade	-	-	20	-
Adulte, aktiv reproduzierende Fische (F₁)				
Verändertes Verhalten	-	-	-	-
Veränderungen in Anzahl und Qualität der Eier	2 (n _{max}) ↓	2 ↓	0,1 ↑	↓
Verringerte Befruchtungsrate	20	2	2	+
Verschiebungen im Geschlechterverhältnis	2	2	2	+
Mißbildungen (z.B. Skoliosen)	-	-	-	-
Erhöhte Sterblichkeit bis zur Geschlechtsreife	50	50	-	+
Embryonal- und Larvalphase (F₂)				
Erhöhte Sterblichkeit	20	2	2	+
Teratogenität (Skoliosen, Ödeme, etc.)	20	2	2	+
Adulte, aktiv reproduzierende Fische (F₂)				
Verändertes Verhalten	-	k. A.	k. A.	-
Veränderungen in Anzahl und Qualität der Eier	2 (n _{max}) ↓	k. A.	k. A.	+
Verringerte Befruchtungsrate	2	k. A.	k. A.	+
Verschiebungen im Geschlechterverhältnis	20	k. A.	k. A.	+
Mißbildungen (z.B. Skoliosen)	-	k. A.	k. A.	-
Erhöhte Sterblichkeit bis zur Geschlechtsreife	50	k. A.	k. A.	+
Histologische Veränderungen (F₁)				
Veränderungen in der Hodenstruktur	-	2	2	-
Pathologische Veränderungen in Ovarien (Athresie)	-	20	2	+
Zwittergonaden	2	2	2	+
Verändertes Verhältnis der Eireifungsstadien	-	20	2	-
Veränderungen in der Leberultrastruktur	2	2	0.1	+

n_{max} = maximale Gelegegröße; ↑ = Zunahme; ↓ = Abnahme, k. A.: keine Angaben

Im Gegensatz dazu konnte beim Medaka im Life Cycle-Experiment mit DHEA im wesentlichen eine androgene bzw. antiöstrogene Wirkung nachgewiesen werden. Die schwerwiegendsten Veränderun-

gen waren hierbei das Auftreten einer Laichblockade bei den mit 100 µg/L DHEA belasteten Weibchen, eine deutliche Vermännlichung der Fische in allen Versuchsgruppen sowie schwere cytopathologische Störungen in der Leberultrastruktur bei einer Belastung mit 100 µg/L DHEA.

8.5 Bewertung des Gefährdungspotentials der untersuchten Substanzen

Die Suche nach einem Instrumentarium zur Bewertung der Relevanz endokriner Belastung für Tier und Mensch ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Ankley et al. 1998, Arcand-Hoy & Benson 1998, Beresford et al. 2000, Gray et al. 1998, Gillesby & Zacharewski 1998, Kavlock 1999, Kortenkamp & Altenburger 1999, Mantovani et al. 1999, Menditto & Turrio-Baldassarri 1999, Safe et al. 1998, Schmidt 1999, Wiseman et al. 1999).

Messungen des Plasma-Vitellogeninlevels in der vorliegenden Untersuchung zeigten eine deutliche Zunahme als Reaktion auf eine Belastung mit Nonylphenol und Ethinylestradiol bei unterschiedlichen Fischarten. Allerdings ist die Aussagekraft solcher Untersuchungen auf Populationsebene begrenzt. Es ist nicht bekannt, inwieweit die Induktion der Vitellogeninproduktion bei männlichen Fischen (und auch bei Weibchen) langfristig die Fitness und das Überleben des Individuums beeinträchtigen. Als gesichert gilt jedoch, dass Vitellogenin sich im Plasma anreichert (Chen et al. 1986) und Schwierigkeiten bei der Exkretion bereitet. Regenbogenforellen (Herman & Kinclaid 1988) sowie die juvenilen Karpfen aus der vorliegenden Untersuchung (Schwaiger et al. 2000) zeigten nach Belastung mit 17β-Estradiol bzw. Ethinylestradiol schwerwiegende Veränderungen in der Niere, welche eine Akkumulation elektronendichter Stoffe, tubuläre Nekrosen und Nierenblutungen beinhalteten. Zusätzlich war die Mortalität der Regenbogenforellen ungewöhnlich hoch. Außerdem wird angenommen, dass die für die Vitellogenese benötigte Energie dem normalen Stoffwechsel verloren geht und außerdem auch das Wachstum und die Entwicklung negativ beeinflussen kann (Ashfield et al. 1998). Außerdem konnte die Vitellogenese mit einer Reduktion des Hodenwachstums in Verbindung gebracht werden, was als reproduktionsrelevanter Faktor gewertet werden kann (Fisher et al. 1999, Gimeno et al. 1996, Gray & Metcalfe 1997, Kinneberg et al. 2000, Wester & Canton 1986).

Korreliert man den durch östrogen wirksame Substanzen induzierten Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts mit den Ergebnissen der ultrastrukturellen Untersuchungen, so sind die verursachten Veränderungen zwar überwiegend adaptiv, jedoch können auch einige wenige degenerative Effekte beobachtet werden (z. B. Dilatation der rER-Zisternen), welche langfristig zu Einschränkungen in der Proteinbiosynthese und möglicherweise somit auch zu Beeinträchtigungen der allgemeinen Fitness führen.

Somit sind Toxizitätstests wie ultrastrukturelle Veränderungen der Leber und Messung des Vitellogeningehalts, die auf der Ebene sublethaler Exposition eingesetzt werden, zwar sinnvolle Marker einer endokrinen Belastung und werden routinemäßig für die traditionelle Risikoabschätzung verwendet. Sie sind jedoch für die Detektion von Beeinträchtigungen des Reproduktionserfolgs durch Mechanismen und Substanzen, die das endokrine System modulieren, als unzureichend anzusehen.

Sowohl die OECD wie auch die Amerikanische Umweltbehörde EPA fordern daher *in vivo*-Testsysteme für zahlreiche Schutzprogramme, welche LC 50-Tests, Early Life-Stage-Tests, sowie

verkürzte und vollständige Life Cycle-Experimente beinhalten (U. S. Environmental Protection Agency 1989, 1994 a, b, OECD 1992). Von besonderer Bedeutung sind hierbei vollständigen Life Cycle-Tests, da sie sowohl die Embryonal- und Larvalphase beinhalten, in der der Östrogenspiegel sehr gering ist und die sexuelle Differenzierung stattfindet (Gullette et al. 1994, Schäfer et al. 1997, von Westernhagen 1988), wie auch die Adultstadien, in denen sich Veränderungen in Schlüsselprozessen wie der Geschlechtsdifferenzierung manifestieren (Barollier et al. 1999). Darüber hinaus bieten Life Cycle-Experimente die Möglichkeit, über eine Untersuchung der Larvalentwicklung der F₂-Generation Aufschluß über generationsübergreifende Effekte zu gewinnen.

Ein weiterer Vorteil der Life Cycle-Experimente liegt in der Vielzahl der möglichen Endpunkte. Die primären Endpunkte des Life Cycle-Experiments sind: Überleben, Verhalten, Wachstum, Entwicklung und Reproduktionserfolg (Ankley et al. 1998). Aus ökologischer Perspektive sind diese Parameter Endpunkte von besonderer Wichtigkeit (Braunbeck 1994), und eine Verringerung kann zu einem Rückgang der Population unter den kritischen Level und damit zur Extinktion der Population führen (Gronen et al. 1999).

Die Life Cycle-Experimente in der vorliegenden Studie haben für alle Substanzen reproduktionsrelevante Einschränkungen gezeigt:

- gesteigerte Larvmortalität in der F₁- und F₂-Generation des Medakas nach Exposition gegenüber Nonylphenol, Octylphenol und 17 β -Estradiol.
- verringerter Befruchtungserfolg und Abnahme der Gelegegröße nach Exposition gegenüber Nonylphenol, Octylphenol und 17 β -Estradiol.
- Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Weibchen nach Exposition gegenüber Nonylphenol, Octylphenol und 17 β -Estradiol.
- Erhöhte Empfindlichkeit der F₂-Generation und ihrer Nachkommen im Life Cycle-Experiment gegenüber einer Exposition mit Nonylphenol in Bezug auf Befruchtungserfolg und Überleben.
- Vermännlichung des Medakas nach Belastung mit DHEA
- Auftreten von Zwittergonaden nach Exposition gegenüber Nonylphenol, Octylphenol, 17 β -Estradiol und DHEA.
- Veränderungen in der Gonadenstruktur nach Belastung mit Octylphenol, 17 β -Estradiol und DHEA.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte für alle in den Life Cycle- Experimenten verwendeten Substanzen populationsrelevante Veränderungen des Reproduktionserfolgs nachgewiesen werden. Anhand der verwendeten Konzentrationen konnte zumindest nach chronischer Belastung mit Nonylphenol eine umweltrelevante Gefährdung auf Populationsebene abgeleitet werden. Im Gegensatz dazu liegen die verwendeten Octylphenolkonzentrationen um das 10-100fache über den Werten, die in der Umwelt anzutreffen sind. Andererseits können schwerwiegende Veränderungen, wie sie durch hohe Schadstoffkonzentrationen über kurze Zeiträume hervorgerufen werden, auch durch geringere Konzentrationen, die dafür über längere Zeiträume wirken, induziert werden (Kinneberg et al. 2000). Der Umstand, dass Organismen in der aquatischen Umwelt üblicherweise lebenslang und über viele Generationen Umweltschadstoffen ausgesetzt sind, fand bisher noch in keiner Untersuchung Beachtung. Um so wichtiger sind die Ergebnisse aus dem vorliegenden Life Cycle-Experiment mit Nonylphenol,

bei dem über zweieinhalb Generationen deutlich fortschreitende Einschränkungen des Reproduktionserfolges (generationsübergreifende Abnahme der Befruchtungsrate, erhöhte Mortalität) zu beobachten war. Diese Ergebnisse sind von besonderer Bedeutung, da sich im Vergleich mit den Ergebnissen aus den Life Cycle-Experimenten über nur einen vollen Generationszyklus eine erhöhte Sensitivität gegenüber Nonylphenol erst zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife der F₂-Generation und deren Nachkommen manifestierten (Tab.27). Daraus läßt sich schließen, dass aquatische Organismen durch eine Exposition gegenüber endokrin wirksamen Substanzen über mehrere Generationen möglicherweise stärker geschädigt werden als anhand Ergebnisse aus einem Early Life-Stage-Test, einem verkürzten Life Cycle-Test oder aber einem normalen Life Cycle-Experiment über 1 ½ Generationen zu vermuten ist.

Andererseits ist zu bedenken, dass die Schadstoffkonzentration in Gewässern stark schwanken können und somit in der Umwelt nicht von einer konstanten Belastung ausgegangen werden kann (Ahel et al. 1987, 1994). Ein weiteres Problem bei der Abschätzung möglicher Risiken durch eine bestimmte Substanz sind mögliche Kombinationswirkungen. In der aquatischen Umwelt sind Organismen in der Regel einer Vielzahl von Substanzen ausgesetzt, welche in ihrer Wirkung synergistisch oder antagonistisch interagieren können (Arnold et al. 1996, 1997, Kortenkamp & Altenburger 1999, Krishnan & Safe 1993, Safe 1991, Safe & Krishnan 1995, Soto et al. 1984, Sumpter & Jobling 1993, 1995). Anhand der vorliegenden Studie über die Wirkung von nonylphenolhaltigem Klärwasser auf juvenile Karpfen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Vitellogenininduktion wie auch die ultrastrukturellen Veränderungen in der Leber nach Exposition gegenüber dem Klärwasser schwächer ausgeprägt waren als nach Belastung mit Nonylphenol als Monosubstanz. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass im Klärwasser Substanzen vorhanden sein müssen, welche einer xenoöstrogenen Belastung entgegen wirken (Kortenkamp & Altenburger 1999, Sumper 1995).

Das wichtigste Ziel der Abschätzung ökologischer Risiken ist es, Lebensgemeinschaften vor schädlichen Einflüssen durch anthropogene Kontamination zu schützen (Landis et al. 1995). Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, dass ein erhöhter Forschungsbedarf über die Kinetik der Dosis-Wirkungs-Beziehung einer bestimmten Substanz sowie über mögliche Kombinationswirkungen besteht. Darüber hinaus existiert kaum Wissen aus Multigenerationsexperimenten mit endokrinen Disruptoren. Für eine gezielte Abschätzung von Risiken einer endokrinen Belastung sind deshalb eine Vielzahl von Tests erforderlich, welche einerseits *In vitro*-Verfahren zur Ermittlung einer potentiellen endokrinen Wirksamkeit und *In vivo*-Testverfahren zur Abschätzung einer endokrinen Gefährdung auf Populationsebene beinhalten. Aufgrund der Komplexität der durch endokrin wirksame Substanzen hervorgerufenen Veränderungen im Organismus sind Life Cycle-Experimente über mehrere Generationen von besonderer Wichtigkeit.

9. Zusammenfassung

Während der letzten 50 Jahre verdichteten sich die Hinweise, dass einigen Substanzen eine hormonähnliche Wirkung auf Organismen besitzen, was zu einer zunehmenden Besorgnis über die potentielle Gefährdung durch diese Substanzen führte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand der expositionsbedingten Veränderungen des Plasma-Vitellogeningehalts und der Leberultrastruktur das endokrine Potential von Alkylphenolen sowie künstlichen und natürlichen Steroiden und die Reaktion verschiedener Fischarten auf eine Belastung zu ermitteln. Außerdem wurde in mehreren Life Cycle-Experimenten mit dem Medaka reproduktions- und populationsrelevante Veränderungen analysiert, um auf diese Weise eine Abschätzung des Gefährdungspotentials durch Alkylphenole, künstliche und natürliche Steroide durchzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl juvenile wie auch adulte Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) nach Belastung mit Nonylphenol bzw. 17α -Ethinylestradiol mit einem Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts, der bei den adulten Forellen nach Belastung mit 17α -Ethinylestradiol etwa 40fach höher war als bei den juvenilen Tieren, reagierten.

Eine Exposition juveniler Karpfen gegenüber nonylphenolhaltigem Klärwasser (Konzentrationen 1, 10 $\mu\text{g/L}$) sowie mit 1 und 10 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol ergab für die Klärabwässer einen deutlich schwächeren Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts als nach Belastung mit Nonylphenol als Monosubstanz. Auch nach Belastung mit dem Ablauf der Kläranlage Starnberger See konnte bei adulten männlichen Regenbogenforellen ein Anstieg des Plasma-Vitellogeningehalts beobachtet werden.

Untersuchungen der Leberultrastruktur ergaben bei allen untersuchten Fischarten eine Proliferation des rauen endoplasmatischen Reticulums (rER) sowie eine Aktivitätszunahme des Golgi-Apparates. Dabei konnten die deutlichsten Veränderungen bei den adulten weiblichen Forellen beobachtet werden. Die ultrastrukturellen nonylphenolinduzierten Veränderungen in der Leber sind bei allen untersuchten Fischarten als adaptiv zu bezeichnen, während eine Exposition gegenüber 17α -Ethinylestradiol in einer Dilatation des rER resultierte, was auf eine Störung der Proteinsynthese hinweist. Die adulten Regenbogenforellen reagierten am stärksten mit ultrastrukturellen Veränderungen der Leber, gefolgt von den juvenilen Regenbogenforellen und Karpfen. Der Medaka zeigte als Reaktion auf eine Belastung mit Nonylphenol bzw. 17β -Estradiol die geringsten Veränderungen.

Im Life Cycle-Experiment mit dem Medaka über 2 volle Generationszyklen konnten nach Belastung mit Nonylphenol eine generationsübergreifende Verringerung der Befruchtungsrate und des Überlebens der Nachkommen beobachtet werden. Außerdem zeigten die Medakas eine Vergrößerung des Weibchenanteils der Versuchsgruppen sowie das Auftreten von Zwittergonaden.

Auf eine Belastung mit Octylphenol über einen Generationszyklus reagierten die Medakas mit verringertem Wachstum und einem Rückgang der Befruchtungsrate sowie einer erhöhten Mortalität. Auch bei diesem Life Cycle-Test konnte eine Verweiblichung sowie das Auftreten von Zwittergonaden beobachtet werden. Der Vergleich mit Nonylphenol ergab, dass Octylphenol über ein höheres endokrines Potential verfügt als Nonylphenol, da die reproduktionsrelevanten Veränderungen nach Belastung zwar ähnlich waren, aber bei Octylphenol bei einer 10fach niedrigeren Konzentration als bei Nonylphenol erstmalig auftraten.

Auch bei den ultrastrukturellen Veränderungen nach Exposition des Medakas gegenüber Nonylphenol und Octylphenol konnte das stärkere endokrine und toxische Potential von Octylphenol nachgewiesen werden.

Eine Belastung des Medakas mit Dehydroepiandrosteron (DHEA) im Life Cycle-Experiment resultierte in einer verringerten Befruchtungsrate, einer deutlichen Vermännlichung der Weibchen sowie einer Verschiebung des Geschlechterverhältnisses und das Auftreten von Zwittergonaden. Die Leberultrastruktur zeigte bei einer Belastung mit 100 $\mu\text{g/L}$ DHEA eine Verringerung der Proteinbiosynthese, welche sich in einer starken Kondensation des Nucleolus sowie einer verstärkten Fragmentierung und Dilatation des rER und des Golgi-Apparates manifestierte.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, dass Fische je nach Art, Alter, Geschlecht und Stand im Laichzyklus leicht unterschiedliche Reaktionen auf eine Belastung mit Nonylphenol und Ethinylestradiol zeigen. Außerdem zeigten die geringere Ausprägung der schadstoffinduzierten Veränderungen nach Exposition gegenüber den Abläufen von Kläranlagen im Vergleich mit Monosubstanzen, dass es sich bei dem Abwasser der Kläranlagen um ein Gemisch von endokrin wirksamen Substanzen handelt, welche in ihrer Wirkung synergistisch oder antagonistisch interagieren können.

Von besonderer Bedeutung sind jedoch die populationsrelevanten Einschränkungen im Reproduktionserfolg, wie sie nach Exposition gegenüber Nonylphenol, Octylphenol, DHEA und 17β -Estradiol beim Medaka im Life Cycle-Experiment nachgewiesen werden konnten. Die verwendeten Konzentrationen liegen zumindest für Nonylphenol im umweltrelevanten Bereich, weswegen die generationenübergreifenden Effekte im Nonylphenol-Life Cycle-Experiment besonders wichtig sind, da sie zeigen, dass eine chronische Exposition mit endokrin wirksamen Substanzen über mehrere Generationen schwerwiegendere Wirkungen auf Wildpopulationen haben könnte, als mit den herkömmlichen Testmethoden nachgewiesen werden kann.

10. Literatur

- Abraham, E. J., Frawley, L. S. (1997) Octylphenol (OP), an environmental estrogen, stimulates prolactin (PRL) gene expression. *Life Sci.* 60(17): 1457-1465.
- Adams, S. M., McLean, R. B. (1985) Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmonides* Lacépède, growth using the liver somatic index and physiological variables. *J Fish Biol.* 26: 111-126.
- Ahel, M. C., Conradt, T., Goger, W. (1987) Persistent organic chemicals in sewage effluents. 3. Determinations of nonylphenoxy carboxylic acids by high resolution gas chromatography/mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 21: 697-703.
- Ahel, M. C., Schaffner, C., Giger, W. (1996) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res.* 30, 37-46.
- Ahel, M., Giger, W. (1993a) Partitioning of alkylphenoles and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26(8): 1471-1478.
- Ahel, M., Giger, W. (1993b) Solubility of alkylphenols and alkylphenolethoxylates in water. *Chemosphere* 27: 1235-1241.
- Ahel, M., McEvoy, J., Giger, W. (1993c) Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Poll.* 79: 243-248.
- Ahel, M., Scully, F. E., Hoigné, J., Giger, W. (1994) Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. *Chemosphere* 28(7): 1361-1368.
- Aherne, G. W., Briggs, R. (1989) The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *J Pharm. Pharmacol.* 41: 735-736.
- Allen, Y., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J. E., Feist, S. (1999) Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuaries and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Plathichthys flesus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1791-1800.
- Allner, B., Wegener, G., Knacker, T., Stahlschmidt-Allner, P. (1999) Electrophoretic determination of estrogen-induced protein in fish exposed to synthetic and naturally occurring chemicals. *Sci. Total Environ.* 233: 21-31.
- Andersson, T., Forlin, L., Harig, I., Larsson, A. (1988) Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft mill effluents. *Can. J Fish. Aquat. Sci.* 45: 1525-1536.
- Ankley, G., Mihaich, E., Stahl, R., Tillit, D., Colborn, T., McMaster, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Dickerson, R., Folmar, L., Fry, M., Giesy, J., Earl Gray, L., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., LeBlanc, G., Mayes, M., Nimrod, A., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., Van Der Kraak, G., Zacharewski, T. (1998) Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Tox. Chem.* 17(1): 68-87.
- Arcand-Hoy L. D., Benson W. H. (1998) Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(1): 49-57.
- Arias, I. M., Popper, H., Schlachter, D., Schafritz, D. A. (1988) Bioindikatoren – Möglichkeiten, Grenzen, neue Erkenntnisse. Ulmer Verlag Stuttgart.
- Arnold, H. (1995) Die Wirkung von Pestiziden auf Monitororgane und -zellen bei Fischen: -ein Vergleich von sublethalen Effekten in Einzelstudien und im Kombinationsexperiment. Dissertation Universität Heidelberg, S. 1-193.

- Arnold, H., Braunbeck, T. (1994) Disulfoton as a major toxicant in the Rhine chemical spill at Basle in 1986: acute and chronic studies with eel and rainbow trout. In: Müller, R., Lloyd, R. (eds.) Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Fishing News Books, Blackwell Science Publ. Pp. 75-87.
- Arnold, H., Pluta, H. J. , Braunbeck, T. (1995) Simultaneous exposure to endosulfan and disulfoton in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicol. 33: 17-43.
- Arnold, S. F., Robinson, M. K., Notides, A. C., Guillette, L. J., McLachlan, J. A. (1996) A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. Environ Health Perspect 104(5): 544-548
- Arnold, S. F., Vonier, P. M., Collins, B. M., Klotz, D. M., Guillette, L. J., McLachlan, J. A. (1997) In vitro synergistic action of alligator and human estrogen receptors with combinations of environmental chemicals. Environ. Health Perspect. 105 (Suppl 3): 615-618.
- Arukwe, A., Knudsen, F. R., Goskoyr, A. (1997) Fish zona radiata (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental entrogens. Environ. Health Perspect. 105(4) 418-422.
- Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebringtsen, K., Celius, T., Goksøyr, A., Cravedi, J. P. (2000) *In vivo* and *in vitro* metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquatic Toxicol. 49 (249): 289-304.
- Ashfield, L. A., Pottinger, T. G., Sumpter, J. P. (1998) Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic indices. Environ. Toxicol. Chem. 3: 679-686.
- Balaguer, P., Joyeux, A., Denison, M. S., Vincent, R., Gillesby, B. E., Zacharewski, T. (1996) Assessing the estrogenic and dioxin-like activities of chemicals and complex mixtures using *in vitro* recombinant receptor-reporter gene assays. Can. J. Physiol. Pharmacol. 74: 216-222.
- Baroiller, J. F., Guiguen, Y., Fostier, A.(1999) Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. CMLS 55: 910-931.
- Bartholomew, G. A. (1964) The lores of physiology and behavior in the maintainance of homeostasis in the desert environment. In: Symposia of the Society for Experimental biology (ed.) Homeostasis and feedback mechanisms. Vol. 18. Academic Press, New York, S. 7-21.
- Baski, S. M., Frazier, J. M. (1988) A fish hepatocyte model for the investigation of the effects of environmental contaminants. Mar. Environ. Res. 24: 141-145.
- Bellei, M., Battelli, D., Fornieri, C., Mori, G., Muscatello, U., Lardy, H., Bobyleva, V. (1992) Changes in the liver structure and function after short-term and long-term treatment of rats with dehydroepiandrosterone. J. Nutr. 122(4): 967-976.
- Bennett, E. R., Metcalfe, C. D. (1998) Distribution of alkylphenol compounds in Great Lake sediments, United States and Canada. Environ. Toxicol. Chem .17: 1230-1235.
- Bennie, D. T., Sullivan, C. A., Lee, H. B., Peart, T. E., Maguire, R. T. (1997) Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxilates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper Lawrence River. Sci. Total. Environ. 193: 263-275.
- Beresford, N., Routledge, E. J., Harris, C. A., Sumpter, J. P. (2000) Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 162(1): 22-33.
- Bern, H. A. (1992) The fragile fetus. In: Colborn, T., Clements, C. (eds.) Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. Princeton Scientific, Princeton N. Y. pp. 1-15.

- Bernadier, C. D., Parnette, J. A., McIntosh, M. K. (1993) Is dehydroepiandrosterone an antiobesity agent? *FASEB J.* 7:414-419.
- Bingert, A., Litzén, K., Odsjö, T., Olsson, M., Persson, W., Reutergårdh (1995) Time-related factors influence the concentrations of sDDT, PCBs and shell parameters in eggs of Baltic guillemot (*Urica aalge*) *Environ. Pollut.* 89: 27-36.
- Birnbaum, L. S. (1995) Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting levels. *Toxicology Letters* 82/83: 743-750.
- Bitman, J., Cecil, H. C. (1970) Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J. Agric. Food. Chem.* 18, 1108-1112.
- Blackburn, M. A., Waldock, M. J. (1995) Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res.* 29: 1623-1629.
- Blake, C. A., Ashiru, O. A. (1997) Disruption of rat estrous cyclicity by the environmental estrogen 4-tert-octylphenol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216(3): 446-51.
- Blake, C. A., Boockfor, F. R. (1997) Chronic administration of the environmental pollutant 4-tert-octylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and testosterone. *Biol. Reprod.* 57: 255-266.
- Bon, E., Barbe, U., NuñezRodríguez, J., Cuisset, B., Pelissero, C., Sumpter, J. P., Le Menn, F. (1997) Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Establishment and validation of an ELISA. *Comp. Biochem. Physiol.* 117 B(1): 75-84.
- Boockfor, F. R., Blake, C. A. (1997) Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermiogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. *Biol. Reprod.* 57: 267-277.
- Braunbeck, T. (1992) Umweltcytologie-zelluläre Reaktionen zum Nachweis einer Schadstoffbelastung von Organismen. *Ruperto Carola* 85: 61-85.
- Braunbeck, T. (1994) Detection of environmentally relevant concentrations of toxic organic compounds using histological and cytological parameters: substance-specificity in the reaction of rainbow trout liver? *Fish New Books, Blackwell Science Publ.* Pp. 15-29.
- Braunbeck, T. (1995) Zelltests in der Ökotoxikologie – Cytotoxizitätstests mit Zellkulturen aus Fischen als Alternative und Ergänzung zu konventionellen Fischtests. In: Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (Hrsg.), *Veröff. PAÖ* 12: 345-358.
- Braunbeck, T. (1998) Cytological alterations in fish hepatocytes following *in vivo* and *in vitro* sublethal exposure to xenobiotics – structural biomarkers of environmental pollution. In: Braunbeck, T., Hinton, D. E., Streit, B. (eds.), *Fish exotoxicology*, Birkhäuser, Basel Boston Berlin, pp. 61-140.
- Braunbeck, T. A., Teh, S. J., Lester, S. M., Hinton D. E. (1992) Ultrastructural alterations in liver of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to diethylnitrosamine. *Toxicol. Pathol.* 20(2): 179-196.
- Braunbeck, T., Arnold, H., Burkhard-Holm, P. (1994) Sublethale Veränderungen bei Fischen durch Pestizide. *Proceedings des Abschlußsymposiums zum Sandoz-Reinfonds*: 60-66.
- Braunbeck, T., Burkhard-Holm, P., Görge, G.; Nagel, R., Negele, R.-D.; Storch, V. (1992a) Regenbogenforelle und Zebraäbrbling, zwei Modelle für verlängerte Toxizitätstests: Relative Empfindlichkeit, Art- und Organspezifität in der cytopathologischen Reaktion von Leber und Darm auf Atrazin. *Schriftenr. Verein Wasser-, Boden-, Lufthygiene* 89: 109-145
- Braunbeck, T., Burkhardt-Holm, P., Storch, V. (1990a) Liver pathology in eels from the Rhine river exposed to the chemical spill at Basle in November 1986. In: Kinzelbach/Friedrich (Hg.) *Limnologie aktuell Band 1: Biologie des Rheins*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York: 371-392.

- Braunbeck, T., Görge, G., Storch, V., Nagel, R. (1990b) Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachidanio rerio*) induced by long term exposure to gamma-hexachlorcyclohexane. *Ecotox. Environ. Safety* 19: 355-374.
- Braunbeck, T., Segner, H. (1992b) Preexposure temperature acclimation and diet as modifying factors for the tolerance of golden die (*Leuciscus idus melanotus*) to short term exposure to 4-chloraniline. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 24: 72-94.
- Braunbeck, T., Storch, V., Bresch, H. (1990c) Species-specific reaction of liver ultrastructure in Zebrafish (*Brachidanio rerio*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to 4-chloraniline. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 405-418.
- Braunbeck, T., Storch, V., Nagel, R. (1989) Sex-specific reactions of liver ultrastructure of zebrafish (*Danio rerio*) after prolonged exposure to 4-nitrophenol. *Aquatic Toxicology* 14: 185-202.
- Braunbeck, T., Völkl, A. (1993) Toxicant-induced cytological alterations in fish liver as biomarkers of environmental pollution? A case study on hepatocellular effects of dinitro-o-cresol in golden die (*Leuciscus idus melanotus*) In: Braunbeck, T., Hanke, W., Segner, H.: *Fish Ecotoxicology and Ecophysiology*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim: 55-80.
- Buckley, L. J. (1984) RNA/DNA ratio: An index for larval growth in the sea. *Mar. Biol.* 80: 291-298.
- Bun Ng, T., Woo, N. Y. S., Tam, P. P. L., Au, C. Y. W. (1984) Changes in metabolism and hepatic ultrastructure induced by estradiol and testosterone in immature female *Epiphelus akaara* (Teleostei, Serranidae). *Cell. Tissue. Res.* 236: 651-659.
- Burkhardt-Holm, P., Braunbeck, T., Storch, V. (1990) Auswirkungen der beim Sandoz-Unfall im November 1986 in den Rhein gelangten Chemikalien auf die Ultrastruktur des Darms von Aalen. In: Kinzelbach/Friedrich (Hg.) *Limnologie aktuell Band 1: Biologie des Rheins*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York: 393-404.
- Carlson D. B., Williams D. E. (1999) Sex-specific vitellogenin production in immature rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(10): 2361-2363.
- Charuk, M. H., Grey, A. A., Reithmeier, R. A. (1998) Identification of the synthetic surfactant nonylphenol ethoxylate: a P-glycoprotein substrate in human urine. *Am. J Physiol.* 274(6 Pt 2): 1127-1139.
- Chen, T. T., Reid, P. C., van Beneden, R., Sonstegard, R. A. (1986) Effect of Aroclor 1254 and Mirex on estradiol-induced vitellogenin production in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 169-173.
- Christiansen, L. B., Pedersen, K. L., Pedersen, S. N., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2000) *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(7): 1967-1874.
- Clark, L. B., Rosen, R. T., Hartman, T. G., Louis, J. B., Suffet, I. H., Lippincott, R. L., Rosen, J. D. (1992) Determination of alkylphenol ethoxylates and their acetic acid derivates in drinking water by particle beam liquid chromatography/mass spectrometry. *Intern. J Environ. Anal. Chem.* 47: 167-180.
- Cleary, M. P. (1990) The role of DHEA in obesity. In: Kalimi, M., Regelson, W. (eds.) *The biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Walter de Gruyter & Co, Berlin, New York, S.206-230.
- Colborn, T. (1995) Environmental oestrogen: health implications for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 103: 135-136.
- Colborn, T., Clement, C. (eds., 1992) *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the Wildlife/human connection*. Princeton scientific publishin, Princeton, NY.

- Colborn, T., vom Saal, F. S., Soto, A. M. (1993) Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101: 378-384.
- Coldham, N. G., Sivapathasundaram, S., Dave, M., Ashfield, L. A., Pottinger, T. G., Goodall, C., Sauer, M. J. (1998) Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Drug. Metabol. Dispos.* 26(4): 347-353.
- Condeça, J. B., Canario, A. V. (1999) The effect of estrogen on the gonads and on *in vitro* conversion of androstenedione to testosterone, 11-ketotestosterone, and estradiol-17 β in *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 116(1): 59-72.
- Copeland, P. A., Sumpter, J. P., Walker, T. K., Croft, M. (1986) Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) at various stages of reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B(2): 487-493.
- Cough, J. A. (1975) Histopathological effects of pesticides and related chemicals on the liver of fishes. In: Ribelin, W. E., Migaki, G. (eds.) *The pathology of fishes*. University of Wisconsin Press, Madison pp. 515-557.
- Cummings, A. M., Gray, L. E. (1987) Methoxychlor affects the decidual cell response of the uterus but not other progestational parameters in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90: 330-341.
- Danzo, B. J. (1997) Environmental xenobiotics might disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands of steroid receptors and binding proteins. *Environ. Health Perspect.* 105: 294-301.
- Davidson N. E., Yager, J. D. (1997) Pesticides and breast cancer: fact or fad? *J Natl. Cancer Inst.* 89: 1742-1744.
- Dehennin, L., Ferry, M., Lafarge, P., Pérès, G., Lafarge, J.-P. (1998) Oral administration of dehydroepiandrosterone to healthy men: Alteration of urinary androgen profile and consequences for the detection of abuse in sport by gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids* 63: 80-87.
- Desbrow, C., Routledge, E., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., Waldock, M. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. I. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32: 1549-1558.
- Donaldson, E. M., Fagerlund, U. H. M., Higgs, D. A., McBride, J. R. (1979) Hormonal enhancement of growth. In: Hoar, W. S., Randall, D. J., Brett, J. R. (eds.) *Fish Physiology*. Vol. VIII – Bioenergetics and growth. Academic Press, New York, N. Y., USA pp. 456-597.
- Dorfman, R. I., Dorfman, A. S. (1954) Estrogen assay using the rat uterus. *Endocrinology* 55: 65-69.
- Duax, W. L., Griffin, J. F. (1985) Structure-activity relationships of estrogenic chemicals. In: McLachlan, J. A. (ed.) *Estrogens in the environment*. Elsevier, New York, S. 15-24.
- Earl Grey, L., Ostby, J., Wolf, C., Lambright, C., Kelce, W. (1998) The value of mechanistic studies in laboratory animals for the prediction of reproductive effects in wildlife: endocrine effects on mammalian sexual differentiation. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1): 109-118.
- Ekelund, R., Granmo, Å., Magnusson, K., Berggren, M. (1990) Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals – a re-evaluation. *Environ. Pollut.* 64:107-120.
- El-Alfy, M., Luu-The, V., Huang, X.-F., Berger, L., Labrie, F., Pelletier, G. (1998) Localisation of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology* 140(3): 1481-1491.
- Engami, N. (1955) Production of an testis-ova in adult males of *Oryzias latipes* I. Testis-ova in the fish receiving estrogens. *Jpn. J. Zool.* 11: 353-365.

- Eroschenko, V. P., Palmiter, R. D. (1980) Estrogenicity of kepone in birds and mammals. In: Estrogens in the environment. McLachlan, J. A. (ed.) Elsevier, New York S. 320-341.
- Etnier, E. L. (1986) Chemical hazard information profile- nonylphenol. Office of toxic substances, Washington DC
- European Community (1997) European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Workshop Publication EUR 17549, Paris, France.
- Falandysz, J., Yamashita, N., Tanabe, S., Tusukawa, R., Rucinska, L., Mitera, T., Jakuczum, B. (1994) Congener-specific analysis of polychlorinated biphenyls in white tailed sea eagles *Haliaeetus albililla* collected in Poland. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26: 13-22.
- Familiari, G., Toscano, V., Motta, P. M. (1985) Morphological studies of polycystic mouse ovaries induced by dehydroepiandrosterone. Cell Tissue Res. 240 (3): 519-528.
- Fioroni, P., Oehlmann, J., Stroben, E. (1991) The pseudohermaphroditism of prosobranchs; morphological aspects. Zool. Anz. 226: 1-26.
- Fisher, J.S., Turner, K.J., Brown, D., Sharpe, R.M. (1999) Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. Environ. Health Perspect. 107(5): 397-405.
- Folmar, L. C., Denslow, N. D., Rao, V., Chow, M., Crain, D. A., Enbolm, J., Marcino, J., Guliette, L. J. (1996) Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. Environ. Health Perspect. 104: 1096-110.
- Förlin, L., Larsson, D. G. J., Parkonen, J., Nilsson, M., Hellman, H., Olsson, P.-E., Adolfsson, M. (1999) Endocrine disruption responses in fish near sewage treatment works and pulp mills in Sweden. Abstract 9th Annual Meeting of SETAC Europe, 1999, Leipzig, Germany.
- Frenkel, R. A., Slaughter, C. A., Orth, K. (1990) Peroxisome proliferation and induction of peroxisomal enzymes in mouse and rat liver by dehydroepiandrosterone feeding. J. Steroid. Biochem. 35: 333-342.
- Fritsche, S.; Steinhard, H. (1999) Eur. Food. Res. Technol. 209: 153-179
- Fry, D.M. (1995) Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. Environ. Health. Perspect. 103: 165-171.
- Gagné, F., Blaise, C. (1995) Evaluation of genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow hepatocytes. Environ. Toxicol. Water Qual. 10: 217-229.
- Gellert, R. J. (1978) Uterotropic activity of polychlorinated biphenyls (PCB) and induction of precocious reproductive ageing in neonatally treated female rats. Environ. Res. 16: 123-143.
- Geneser, F. (1990) Histologie. Deutscher Ärzte-Verlag Köln 800 S.
- Gerundo, N., Aldermann, D. J., Clifton-Hadley, R. S., Feist, S. W. (1991) Pathological effects of repeated doses of malachite green: a preliminary study. J Fish. Dis. 14: 521-532.
- Ghadially, F. N. (1982) Ultrastructural pathology of the cell matrix. Vol. 1 & 2, Butterworth, London.
- Giger, W., Brunner, P. H., Schaffner, C. (1984) 4-nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. Science 225: 623-625.
- Gillesby, B. E., Stanostefanos, M., Safe, S., Wu, Z. F., Zacharewski, T. R. (1997) Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. Biochemistry 36: 6080-6089.
- Gillesby, B. E., Zacharewski, T. R. (1998) Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment. Environ. Toxicol. Chem. 17 (1): 3-14.

- Giméno, S., Komen, H., Venderbosch, P. W., Bowmer, T. (1997) Disruption of sexual differentiation in genetic male common Carp (*Carassius carpio*) exposed to an Alcyphenol during different life stages. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2884-2890.
- Gingerich, W. H. (1982) Hepatic toxicology in fish. In: Weber, L. J. (ed.) *Aquatic toxicology*. Raven Press, New York, S. 55-105.
- Gonzales, F. J. (1997) Recent update on the PPAR alpha-null mouse. *Biochimie* 79(2): 139-144.
- Gordon, G. B., Shantz, L. M., Talalany, P. (1987) Modulation of growth, differentiation and carcinogenesis by dehydroepiandrosterone. *Adv. Enzyme Reg.* 26: 355-382.
- Gorski, J., Raker, B. (1974) Estrogen action in the uterus: The requisite for sustained estrogen binding in the nucleus. *Gynecol. Oncol.* 2: 249-258.
- Gotz, F., Pfeiffer, U., Rohde, W., Dorner, G. (1983) Influence of neonatally administered dehydroepiandrosterone on reproduction of rats. *Endokrinol. Exp.* 17(1): 11-15.
- Gray M. A., Teather K. L., Metcalfe C. D. (1999b) Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(11): 2587-2594.
- Gray, M. A., Metcalfe, C. D. (1997) Induction of testis-ova in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(5): 1082-1086.
- Gray, M. A., Niimi, A. J., Metcalfe, C. D. (1999a) Factors affecting the development of testis-ova in medaka, *Oryzias latipes*, exposed to octylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(8): 1835-1842.
- Gronen, S., Denslow, N., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D., Brouwer, M. (1999). Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health. Perspect.* 107(5), 385-390.
- Guillette, L. J., Craun, D. A., Rooney, A. A., Rickford, D. B. (1995a) Organisation versus activation: The role of endocrine- disrupting contaminants (EDC's) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health Perspect.* 103 (7): 157-164.
- Guillette, L. J., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. A., Percival, H. F. (1996) Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101: 32-42.
- Guillette, L. J., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., Woodward, A. R. (1994) Developmental abnormalities of the gonad in abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and controllakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 102 (8): 680-688.
- Guillette, L. J., Jr., Gross, T. S., Gross, D. A., Rooney, A. A., Percival, H. F. (1995b) Gonadal Steroidogenesis in Vitro from Juvenile Alligators Obtained from Contaminated or Control Lakes. *Environ. Health Perspect.* 103: 31-36.
- Guzelian, P. S. (1982) Comparative toxicology of chlordecone (kepone) in humans and environmental animals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22: 89-113.
- Hacking, M. A., Budd, J., Hodson, K. (1978) The ultrastructure of the liver of the rainbow trout: normal structure and modifications after chronic administration of a polychlorinated biphenyl Aroclor 1254. *Can. J Zool.* 56:477-491.
- Harries, J. E., Jobling, S., Matthiessen, P., Sheahan, D. A., Sumper, J. P. (1995) Effects of trace organics on fish- phase 2. Report compiled for the Department of Environment, London, U. K.
- Harries, J. E., Sheahan, D. A., Jobling, S., Mathiessen, P., Neall, P., Sumpter, J. P., Tyler, T., Zaman, N. (1997) Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 534-542.

- Harries, J. E., Sheahan, D. A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E. J., Rycroft, A., Sumper, J. P., Taylor, T. (1996) A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1993-2002.
- Hawkes, J. (1980) The effects of xenobiotics on fish tissue: morphological studies. *Fed. Proc.* 39: 3230-3236.
- Hawrelak, M., Bennet, E., Metcalfe, C. (1999) The environmental fate of the primary degradation products of alkylphenol ethoxylate surfactants on recycled paper sludge. *Chemosphere* 39(5): 745-752.
- Heinis, L. J., Knuth, M. L., Liber, K., Sheedy, B. R., Tunell, R. L., Ankley, G. T. (1999) Persistence and distribution of 4-nonylphenol following repeated application to littoral enclosures. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(3): 363-375.
- Heinz, G. H., Percival, H. F., Jennings, M. L. (1991) Contaminants in American alligator eggs from lake Apopka, lake Griffin, and lake Okeechobee, Florida. *Environ. Monitor. Assess.* 19: 277-285.
- Helander, B., Olsson, M., Reutergård, L. (1982) Residue levels of organochlorine and mercury compounds in unhatched eggs and the relationship to breeding success in white tailed sea eagles *Haliaeetus albililla* in Sweden. *Holarctic Ecol.* 5: 349-366.
- Hellawell, J. M. (1986) Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. Elsevier, New York.
- Heppell, S. A., Denslow, N. D., Folmar, L. C., Sullivan, C. V. (1995) Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.* 103(7): 9-15.
- Herman, R. L., Kincaid, H. L. (1988) Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. *Aquaculture* 72: 165-172.
- Hertz, R. (1985) The estrogen problem: retrospect and prospect. In: Estrogens in the environment. II. Influences on development. McLachlan, J. A. (ed.) Elsevier Science B. V., Amsterdam pp.1-11.
- Hinton, D. E., Klauning, J. E., Lipsky, M. M. (1978) PCB-induced alterations in teleost liver: A model for environmental disease in fish. *Mar. Fish Rev.* 65: 47-50.
- Hirshfeld, M. F. (1980) An experimental analysis of reproductive effort and cost in the Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Ecology* 61: 282-292.
- Hisaw, F. L. (1959) comparative effectiveness of estrogens on fluid imbibition and growth in the rat's uterus. *Endocrinology* 54: 276-289.
- Hock, B., Rothe, S., Seifert, M. (2000) Hormone in der Umwelt - die Tests im Überblick. *Nachrichten aus der Chemie* 48: 918-923.
- Holloway, A. C., Leatherland, J. F. (1997) Effect of gonadal steroid hormones on plasma growth hormone concentrations in sexually immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105(2): 246-54.
- Holtney-Weber, R. (2000) Zur gesundheitlichen Relevanz von Xenoöstrogenen in Wasser und in Lebensmitteln. *GiT Labor-Fachzeitschr.* 9: 1030-1031.
- Hontela, A. (1998) Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(1): 44-48.
- Hyllner, S. J., Oppen-Bernstein, D. O., Helvik, J. V., Walther, B. T., Haux, C. (1991) Oestradiol-17 β induces major vitelline envelope proteins in both sexes in teleosts. *J. Endocrinol.* 131:229-236.
- Ilder, D. R., Campbell, C. M. (1980) Gonadotropin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 41:384-391.

- Islinger, M. (1996) Entwicklung eines Testsystems zur Abschätzung des östrogenen Potentials von Umweltchemikalien. Diplomarbeit vorgelegt der Fakultät für Biologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. 102 S.
- Islinger, M., Pawlowski, S., Hollert, H., Völkl, A., Braunbeck, T. (1999) Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay; *Sci. Total Environ.* 233: 109-122.
- Iwamatsu, T. (1999) Convenient method for sex reversal in a freshwater teleost, the medaka. *J. Exp. Zool.* 283: 210-214.
- Jensen, T. K., Toppari, J., Keiding, N., Skakkaebeck, N. E. (1995) Do environmental oestrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clinical Chemistry* 41: 1896-1901.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., Sumpter, J. P. (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103: 582-587.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Mathiessen, P., Sumpter, J. P. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(2): 194-202.
- Jobling, S., Sumpter, J. P. (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicol.* 27: 361-372.
- Jobling, S., Tyler, C. R., Nolan, M., Sumpter, J. P. (1998) The identification of estrogenic effects in wild fish. R & D Technical Report W 119, Environment Agency, Bristol, U. K.
- Jones, L.A., Hajek, R.A. (1995) Effects of estrogenic chemicals on development. *Environ. Health Perspect.* 103: 63-67.
- Jones, R. C., Engren, R. A. (1973) The effects of various steroids on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284-291.
- Jonkers, C. C. A., de Voogt, P. (1999) Behavior of alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants. Posterbeitrag zur SETAC 1999 in Leipzig
- Kalimi, M., Regelson, W. (1990) The biologic role of dehydroepinandrosterone (DHEA). Walter de Gruyter, Berlin.
- Karnovski, M. J. (1971) Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 51: 146A.
- Kavlock, R. J. (1999) Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. *Chemosphere* 39(8): 1227-1236.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., De Rosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheenan, D. M., Sinks, T., Tilson, H. A. (1996) Research need for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report in the U. S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104: 715-740.
- Kawauchi, H. et al. (1989) The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 29-38.
- Kelce, R. W., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, L. E., Kempainen, J. A., Wilson, E. M. (1995) Persistent DDT metabolite *o,p'*-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375: 581-585.
- Kime, D. E. (1999) A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Sci. Total Environ.* 225(1-2): 3-11.

- Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., Jespersen, A. (2000) Effects of nonylphenol and 17(β)-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *J Exp. Biol.* 203(Pt 2): 171-181.
- Kirchen, R. V., West, W. R. (1976) The Japanese medaka: Its care and development Carolina Biological Supply Company 36 Seiten.
- Klauning, J. E., Lipsky, M. M., Trump, B. F., Hinton, D. E. (1979) Biochemical and ultrastructural changes in teleost liver following subacute exposure to PCB. *J Environ. Pathol. Toxicol.* 2: 953-963.
- Knight, W. M. (1980) Estrogens administered to food producing animals: environmental considerations. In: Estrogens in the environment. McLachlan, J. A. (ed.) Elsevier, New York S. 391-439.
- Koeman, J. H., Van Beusekom, S., Goeji, J. J. M. (1972) Eggshell and population change in the sparrowhawk (*Accipiter nisus*). *TNO-nieuws* 27: 542-550.
- Könemann, W. H., Pieters, M. N. (1996) Confusion of concepts in mixture toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 34(11-12): 1025-1031.
- Kortenkamp, A., Altenburger, R. (1999) Approaches to assessing combination effects of oestrogenic environmental pollutants. *Sci. Total Environ.* 233: 131-140.
- Kowalzki, W., Chatterton, R. T. (1992) Effects of subchronic infusion of dehydroepiandrosterone sulfate on serum gonadotropin levels and ovarian function in the cynomolgus monkey. *Fertil. Steril.* 57(4): 912-920.
- Kramer, V. J., Miles-Richardson, S., Pierens, S. L., Giesy, J. P. (1998) Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17β-estradiol. *Aquatic Toxicol.* 40: 335-360.
- Krisfalushi, M., Cloud, J. G. (1999) Gonadal sex reversal in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Zool.* 284: 466-472.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafson, J. A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol.* 138: 863-870.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafson, J. A. (1996) Cloning of a novel receptorexpressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5925-5930.
- Ladiges, W., Vogt, D. (1979) Die Süßwasserfische Europas. 2. Auflage, Paul Parey Verlag, Hamburg, Berlin 300 S.
- Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. M., Olsson, P.-E., Förlin, L. (1999) Ethinylestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* 45: 91-97.
- Leatherland, J.F. (1992) Endocrine and reproductive function in Great Lakes salmon. In: Colborn, T., Clement, C. (eds.) Chemicallyinduced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. *Adv. Mod. Environ. Toxicol.* pp. 129-145.
- Lee, M. T., Anderson, E., Lee, G. Y. (1991) Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat liver after treatment with dehydroepiandrosterone.
- Lee, P. C., Marquart, M., Lech, J. J. (1998) Metabolism of nonylphenol by rat and human microsomes. *Toxicology Letters* 99: 117-126.
- LeHir, M., Herzog, V., Fahimi, H.D. (1979) Cytochemical detection of catalase with 3,3'diaminobenzidine. A quantitative reinvestigation of the optimal assay conditions. *Histochem.* 64: 5166.

- Leiter, E. H., Beamer, W. G., Coleman, D. L., Longcope, C. (1987) Androgenic and estrogenic metabolites in serum of mice fed dehydroepiandrosterone: relationship and anti-hyperglycemic effects. *Metabolism*. 36: 863-869.
- Lewis, S. K., Lech, J. J. (1996) Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 26(8): 813-819.
- Lin, J. G., Arunkumar, R., Liu, C. H. (1999) Efficiency of supercritical fluid extraction for determining 4-nonylphenol in municipal sewage sludge. *J. Chromatogr. A* 840(1): 71-79.
- Lind, G., Schade, M. (1997) Untersuchungen zum Abbauverhalten ausgewählter Inhaltsstoffe von Wasch- und Reinigungsmitteln sowie Selektion und gezielter Einsatz daran beteiligter heterotropher Bakterien. Abschlußbericht des Landesministeriums für Landesentwicklung und Umweltfragen: 1-42.
- López-Barea, J., Pueyo, C. (1998) Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat. Res.* 399: 3-15.
- Malison, J. A., Kayes, T. B., Wentworth, B. C., Amundson, C. H. (1988) Growth and feeding response of male versus female of yellow perch (*Perca flavescens*) treated with estradiol-17 β . *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1942-1948.
- Mantovani, A., Stazi, A. V., Macri, C., Maranghi, F., Ricciardi, C. (1999) Problems in testing and risk assessment of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental toxicology. *Chemosphere* 39(8): 1293-1300.
- Manzano, M. A., Perales, J. A., Sales, D., Quiroga, J. M. (1998) Effect of concentration on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61(4): 489-496.
- Marcomi, A., Filipuzzi, F., Giger, W. (1988) Aromatic surfactants in laundry detergents and hard-surface cleaners: Linear alkylbenzenesulphonates and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* 17: 853-863.
- Martin, L., Channingbold, P. J. (1960) The mitogenic action of oestrogens in the vaginal epithelium of ovariectomized mouse. *J. Endocrinol.* 20: 173-186.
- Mathiessen, P., Allen, Y., Allchin, C. R., Feist, S. W., Kirby, M. F., Law, R. J., Scott, A. P., Thain, J. E., Thomas, K. V. (1998) Estrogenic endocrine disruption in flounder (*Platichthys flesus* L.) from U.K. estuaries and marine waters. *Sci. Ser. Tech. Rep, CEFA, Lowsoft* 107 pp. 48.
- Mathiessen, P., Sumpter, J. P. (1996) Effects of oestrogenic substances in the aquatic environment. *British Crown Copyright*: 1-16.
- Matsui, K. (1949) Illustration of the normal course of development in *Oryzias latipes*. *Jap. J. Exp. Morphol.* 5: 33-37.
- Matthiessen, P., Gibbs, P. E. (1998) Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 37-43.
- McIntosh, M. K., Goldfarb, A. H., Curtis, L. N., Cote, P. S. (1993) Vitamin E alters hepatic antioxidant enzymes in rats treated with dehydroepiandrosterone (DHEA). *J. Nutr.* 123 (2): 216-224.
- McLeese, D. W., Zitko, V., Sergeant, D. B., Burrige, L., Metcalfe, C. D. (1981) Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere* 10(7): 723-730.
- McMaster, M. E., Munkittrick, K. R., Jardine, J. J., Robinson, R. D., van der Kraak, G. J. (1995) Protocol for measuring *in vitro* steroid production in fish gonadal tissue. *Can. Tech. Report Fish. Aquat. Sci.* 1961.

- McMaster, M. E., van der Kraak, G. J., Portt, C. B., Munkittrick, K. R., Sibley, P. K., Smith, I. R., Dixon, D. G. (1991) Changes in the hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquatic Toxicol.* 21: 199-218.
- Mehldahl, A. C., Nithipatikom, K., Lech, J.J. (1996) Metabolism of several ¹⁴C-nonylphenol isomers by rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*): *in vivo* and *in vitro* microsomal metabolites. *Xenobiotica* 26(11): 1167-1180.
- Menditto, A., Turrio-Baldassarri, L. (1999) Environmental and biological monitoring of endocrine disrupting chemicals. *Chemosphere* 39(8): 1301-1307.
- Metcalf, T. L., Metcalfe, C. D., Kiparissis, Y., Nimi, A. J., Foran, C. M., Benson, W. H. (2000) Gonadal development and endocrine responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *o,p'*-DDT in water or through maternal transfer. *Environ. Tox. Chem.* 19(7): 1893-1900.
- Meyers, T. R., Hendricks, J. D. (1985) Histopathology. In: Rand, G. M., Petrocelli, S. R. (eds.) *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. Hemisphere Publ. Corp. Wash pp. 264-282.
- Mommsen, T. P., Walsch, P. J. (1988) Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar, W. S.; Randall, D. J. (eds.) *Fish Physiology Vol XIA*. Academic Press, New York, S.347-306.
- Monteverdi, G. H., Giulio, R. T. (1999) An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocyte cultures from the Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 62-69.
- Morrison, P.A., Leatherland, J.F., Sonstegard, R.A. (1985) Plasma cortisol and sex steroid levels in Great Lakes coho salmon (*Oncorhynchus kisutch Walbaum*) in relation to fecundity and egg survival. *Comp. Biochem. Physiol.* 80A: 61-68.
- Mueller, G. C., Kim, U. H. (1978) Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols. *Endocrinology* 102: 1429-1435.
- Munkittrick, K. R., Port, C. B., Van der Kraak, G. J., Smith, I. R., Rokosh, D. A. (1991) Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can. J Fish. Aquat. Sci.* 48: 1371-1380.
- Munn, E. A. (1974) *The structure of Mitochondria*. Academic Press, London, New York.
- Nagahama, Y. (1983) The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. (eds.) *Fish Physiology. Vol. Ixa*, Academic Press, New York, S. 347-406.
- Nagel, R. (1988) *Umweltchemikalien und Fische. Beiträge zu einer Bewertung*. Habilitation, Universität Mainz. 256 Seiten
- Nair-Menon, J. U., Campbell, G. T., Blake, C. A. (1996) Toxic effects of octylphenol on cultured rat and murine splenocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139(2): 437-444.
- Nancy, E., Davidson, M. D. (1998) Environmental estrogens and breast cancer risk. *Curr. Opin. Oncol.* 10: 475-478.
- Naylor, C. G., Mieux, J. P., Adams, W. J., Weeks, J. A., Castaldi, F. J., Ogle, L. D., Romano, R. R. (1992) Alkylphenol ethoxylates in the environment. *J Am. Oil. Chemists. Soc.* 69: 695-703.
- Newbold, R. (1995) Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: Implications for other environmental estrogens. *Environ. Health. Perspect.* 103: 83-87.
- Nicolls, T. J., Follet, B. K., Evannett, P. J. (1968) The effects of estrogens and other steroidhormones on the ultrastructure of liver of *Xenopus laevis*. *Z. Zellforsch.* 90: 19.27.

- Nikula, H., Talonpoika, T., Kaleva, M., Toppari, J. (1999) Inhibition of hCG-stimulated steroidogenesis in cultured mouse leydig tumor cells by Bisphenol A and octylphenols. *Tox. Appl. Pharmacol.* 157: 166-173.
- Nimrod, A. C., Benson, W. H. (1996) Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Critical Reviews in Toxicology* 26(3): 335-364.
- Nimrod, A. C., Benson, W. H. (1997) Xenobiotic interaction with and alteration of channel catfish estrogen receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147: 381-390.
- Norberg, B., Haux, C. (1985) Induction, isolation and a characterisation of the lipid content of plasma vitellogenin from two salmo species: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Sea trout (*Salmo trutta*) *Comp. Biochem. Physiol.* 81 B(4): 869-876.
- Odsjö, T., Sondell, J. (1982) Eggshell thinning and DDT, PCB, and mercury in eggs of osprey (*Pandion haliaetus*) in Sweden and their relations to breeding success. In: Odsjö, T. (Ed.) Eggshell thickness and levels of DDT, PCB and mercury in eggs of osprey (*Pandion haliaetus*) and marsh harrier (*Circus aeruginosus*) in relation to their breeding success and population status in Sweden (Ph. D thesis) Stockholm.
- Odum, J., Lefevre, P. A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E. J., Beresford, N. A., Sumpter, J. P., Ashby, J. (1997) The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonylphenols, and comparison with yeast estrogenicity assay. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 25: 176-188.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (1992) Fish early life stage and acute toxicity test. Guideline 204, Section 2, Paris, France.
- Orner, G. A., Donohoe, R. M., Hendricks, J. D., Curtis, L. R., Williams, D. E. (1996) Comparison of the enhancing effects of dehydroepiandrosterone with the structural analog 16-alpha-fluoro-5-androsten-17-one on aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout. *Funct. Appl. Toxicol.* 34(1): 132-140.
- Orner, G. A., Hendricks, J. D., Arbogast, D., Williams, D. E. (1998) Modulation of aflatoxin-B₁ hepatocarcinogenesis in trout by dehydroepiandrosterone (DHEA): Initiation/post-initiation and latency effects. *Carcinogenesis* 19(1): 161-167.
- Orner, G. A., Mathews, C., Hendricks, J. D., Carpenter, H. M., Bailey, G. S., Williams, D. E. (1995) Dehydroepiandrosterone is a complete hepatocarcinogen and potent tumor promotor in the absence of peroxisome proliferation in rainbow trout. *Carcinogenesis* 16(12): 2893-2898.
- Ostrowski, A. C., Garling, D. L. (1986) Dietary androgen-estrogen combinations in growth promotion in fingerling rainbow trout. *Prog. Fish. Cult.* 48: 268-272.
- Oulmi, Y., Braunbeck, T. (1996) Toxicity of 4-chloraniline in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*): I. Cytopathology of liver and kidney after microinjection. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30: 390-402.
- Oulmi, Y.; Braunbeck, T. (1996) Toxicity of 4-chloraniline in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*): I. Cytopathology of liver and kidney after microinjection. *Arch Environ Contam Toxicol* 30: 390-402
- Oulmi, Y.; Negele, R.-D.; Braunbeck, T. (1995) Cytopathology of liver and kidney in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after long term exposure to sublethal concentrations of linuron. *Dis. Aquat. Org.* 21:35-52.
- Ousterhout, J., Struck, R. F., Nelson, J. A. (1981) Estrogenic activities of methoxychlor metabolites. *Biochem. Pharmacol.* 30: 2869-2873.

- Owens, J. W. (1991) The hazard assessment of pulp and paper effluents in the aquatic environment: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1511-1540.
- Papoulias, D. M., Noltie, D. B., Tillitt, D. E. (1999) An in vivo model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinylestradiol. *Aquat. Toxicol.* 48:37-50.
- Parks, L. G., Cheek, A. O., Denslow, N. D., Heppell, S. A., McLachlan, J. A., LeBlanc, G. A., Sullivan, C. V. (1999) Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123(2): 113-125.
- Patino, R., Schreck, C. B. (1986) Sexual dimorphism of plasma sex steroid levels in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisuch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 61: 127-133.
- Patyna, P. J., Davi, R. A., Parkerton, T. F., Brown, R. P., Cooper, K. R. (1999) A proposed multigeneration protocol for the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors. *Sci. Total Environ.* 233: 211-220.
- Peakall, D. B., Lincer, J. L., Riesbrough, R. W., Pritchard, J. B., Kinter, W. B. (1973) DEE-induced eggshell thinning: structural and physiological effects. *Comp. Gen. Pharmac.* 4: 305-313.
- Penzlin, H. (1991) *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena 695 S.
- Petit, F., Le Goff, P., Cravédi, J.-P., Kah, O., Valotaire, Y., Pakdel, F. (1999) Trout oestrogen receptor sensitivity to xenobiotics as tested by different bioassays. *Aquaculture* 177: 353-365.
- Peute, J., Huiskamp, R., van Oordt, P. G. W. J. (1985) Quantitative analysis of estradiol-17 β -induced changes in the ultrastructure of the liver of male zebrafish, *Danio rerio*. *Cell Tissue Res.* 242: 377-382.
- Peute, J., van der Gaag, M. A., Lambert, J. G. D. (1978) Ultrastructure and lipid content of the liver of the Zebrafish, *Brachydanio rerio*, related to vitellogenin synthesis. *Cell Tissue Res.* 186: 297-308.
- Phillips, M. J., Poucell, S., Patterson, J., Valencia, P. (1987) *The Liver - An atlas and text of ultrastructural pathology*. Raven Press, New York.
- Pipan, N., Veranic, P. (1990) The effect of estradiol 17 β on endomembranes and peroxisomes in fish hepatocytes. *Cell Biol. Internat. Rep.* 14, Abstracts Supplement: 118
- Purdom, C. E., Hardiman, P. A., Bye, V. J., Eno, N. C., Tyler, C. R., Sumpter, J. P. (1994) Estrogenic effects from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8: 275-285.
- Raloff, J. (1993) EcoCancers: Do environmental factors underlie a breast cancer epidemic? *Science News* 144: 10-13.
- Raloff, J. (1994) That feminine touch: are men suffering from prenatal or childhood exposures to "hormonal" toxicants? *Science News* 145:49-64.
- Rao, M. S., Musunuri, S., Reddy, J. K. (1992) Dehydroepiandrosterone induced peroxisome proliferation in the rat liver. *Pathobiology* 60: 82-86.
- Ratcliffe, D. A. (1967) Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. *Nature* 215: 208-210.
- Raychoudhury, S. S., Blake, C. A., Millette, C. F. (1999) Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157(3): 192-202.
- Regelson, W., Kalimi, M., Loria, R. (1990) DHEA: Some thoughts as to its biologic and clinical action. In: *The biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA)* Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, S. 405-445.
- Rez, G. (1986) Electron microscopic approaches to environmental toxicity. *Acta biol Hungaria* 37: 31-45.

- Richardson, J.J. (1960) Färbung für Ardalit-: Vestopal- oder Methacrylschnitte. *Stain. Technol.* 35: 313-323.
- Rivera, J., Ventura, F., Cairach, J., De Torres, M., Figueras, A. (1987) GC/MS, HPLC and FAB mass spectrometric analysis of organic micropollutants in Barcelona's water supply. *Int. J Environ. Anal. Chem.* 29: 15-35.
- Rojik, I., Nemcsok, J., Boross, L. (1983) Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fish affected by pesticides. *Acta Biol. Hungarica* 34: 81-92.
- Routledge, Sheanan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M., Sumpter, J. P. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW Effluent 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32: 1559-1565.
- Rubin, B. L., Dorfman, A. S., Black, L., Dorfman, R. I. (1951) Bioassay of estrogens using the mouse uterine response. *Endocrinology* 49: 429-439.
- Ruth, T. S., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogne, E. S., Gorski, J. (1973) Estrone interaction with the rat uterus: *In vitro* response and nuclear uptake. *Endocrinology* 92: 125-134.
- Safe S., Connor K., Gaido K. (1998) Methods for xenoestrogen testing. *Toxicology Letters* 102-103(0): 665-670.
- Safe, S. (1995) Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environ. Health Perspect.* 103: 351-356.
- Safe, S. H. (1997) Xenoestrogens and breast cancer. *N Engl J Med* 337: 1303-1304
- Safe, S., Astroff, M., Harris, M., Zacharewski, T., Dickerson, R., Romkes, M., Biegel, L. (1991) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds as antiestrogens: characterisation and mechanism of action. *Pharmacol. Toxicol.* 69: 400-409.
- Salas, M., Tuchweber, B., Kourounakis, P. (1980) Liver ultrastructure during acute stress. *Pathol. Res. Pract.* 167: 217-233.
- Schäfer, W. R., Zahradnik, H. P., Brückner, B., Herrmann, T. (1997) Chlororganische Umweltchemikalien und Xenoöstrogene im menschlichen Endometrium: *Umweltmed. Forsch. Prax.* 2(4): 281-288.
- Schmidt, C. W. (1999) Answering the endocrine questions. *Environ. Health Perspect.* 107(9): A458-A460.
- Schmude, K. L., Liber, K., Corry, T. D., Stav, F. (1999) Effects of 4-nonylphenol on benthic macroinvertebrates and insect emerge in littoral enclosures. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(3): 386-393,
- Schnurstein, A., Froschauer, A., Leist, E., Braunbeck, T. (1998) Detection of genotoxic substances in primary cultures of liver and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). 8th annual meeting of SETAC-Europe, Bordeaux, France P2A/014.
- Scholz, S., Gutzeit, H. O. (2000) 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 50(4): 363-373.
- Schrenk-Bergt; Ch., Steinberg, Ch. (1998) Endokrine Substanzen in der aquatischen Umwelt. *Handbuch der angewandten Limnologie*: 1-61.
- Schwaiger, J., Negele, R. D. (1998) Plasma vitellogenin-a blood parameter to evaluate exposure of fish to xenoestrogens. *Acta Vet. Brno* 67,257-264.
- Schwaiger, J., Spieser, O. H., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W., Negele, R. D. (2000) Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicol.* 51: 69-78.

- Schwartz, A. G., Hard, G., Pashko, L. L., Abou-Gariba, M., Swern, D. (1981) Dehydroepiandrosterone: an anti-obesity and anti-carcinogenic agent. *Nutr. Cancer* 3: 46-53.
- Schwartz, A. G., Hard, G., Pashko, L. L., Abou-Gariba, M., Swern, D. (1981) Dehydroepiandrosterone: an anti-obesity and anti-carcinogenic agent. *Nutr. Cancer* 3: 46-53.
- Schwartz, A. G., Lewbart, M. L., Pashko, L. L. (1992) Inhibition of tumorigenesis by dehydroepiandrosterone and structural analogs. In: Wattenberg, L., Lipkin, M., Boone, C. W., Kelloff, G. J. (eds.) *Cancer chemoprevention*. CRC Press, Ann. Arbor, S.443-455.
- Schwartz, A. G., Pashko, L. L., Whitcomb, J. M. (1986) Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicol. Pathol.* 14: 357-362.
- Segner, H., Braunbeck, T. (1988) Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in the *Leucociscus idus* (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. *Fish Physiol. Biochem.* 5: 79-97.
- Segner, H., Braunbeck, T. (1990a) Adaptive changes of liver compartmentation and structure in golden ide during winter acclimatisation. *J Exp. Zool.* 255: 171-185.
- Sharpe, R. M., Skakkebaek, N. E. (1993) Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-1395.
- Shelby, M. D., Newbold, R. R., Tully, D. B., Chae, K., Davis, V. L. (1996) Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. *Environ. Health Perspect.* 104: 1296-1300.
- Sherry, J., Gamble, A., Fielden, M., Hodson, P., Burnison, B., Solomon, K. (1999) An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens. *Sci. Total Environ.* 225(1-2): 13-31.
- Shibata, M.-A., Hasegawa, R., Imaida, K., Hagiwara, A., Ogawa, K., Hirose, M., Iro, N., Shirai, T. (1986) Chemoprevention by dehydroepiandrosterone and indomethacin in a rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Res.* 55: 4870-4874.
- Shilling, A. D., Carlson, D. B., Williams, D. E. (1999) Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 70(1-3): 89-95.
- Shioda, T., Wakabayashi, M. (2000) Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 40: 239-241.
- Sindermann, C. J. (1980) The use of pathological effects of pollutants in marine environmental monitoring programs. *Rapp. P-v Réun. Cons. Int. Explor.* 179: 135-151.
- Singer, P. I. (1949) Occupational oligospermia. *JAMA* 180: 1249.
- Singh, J. (1964) A modification of the Masson-Hamperl method for staining of argentophil cells. *Anat. Anz.* 115: 81-82.
- Sire, M.F., Babin, P.J., Vernier, J.M. (1994) Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. *J. Exp. Zool.* 269: 69-83.
- Sonnenschein, C., Soto, A. M. (1998) An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 65(1-6): 143-50.
- Soto, A. M., Chung, K. L., Sonnenschein, C. (1994) The pesticides endosulfan, toxaphene and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health Perspect.* 102: 380-383.
- Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. W., Sonnenschein, C. (1991) p-nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92:167-173.

- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. I., Fernandez, M. F., Olea, N., Serrano, F. O. (1995) The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103(Suppl 7): 113-122.
- Sprague, J. B. (1985) Factors that modify toxicity. In: *Fundamentals of aquatic toxicology*, Rand, G. M., Petrocelli, S. R. (eds.) Hemisphere, Cambridge, New York, S. 125-163.
- Spurr, A. R. (1969) A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruc. Res.* 26: 31-43.
- Stebbing, A. R. D. (1985) A possible synthesis. In: *The effects of stress and pollution on marine animals*. Bayne, B. L. 301-314 Praeger Publishers
- Steinhäuser, G. S. (Prüfung und Bewertung wassergefährdender Stoffe. Sachstand und Probleme. *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.* 8(1): 22-23
- Stephanou, E., Giger, W (1982) Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenoxyethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 16: 800-805.
- Stone, R. (1994) Environmental estrogens stir debate. *Science* 265: 308-311.
- Storch, V., Welsch, U., Schünke, M., Wodke, E. (1984a) Einfluß von Temperatur und Nahrungsentzug auf die Hepatocyten von *Cyprinus carpio*. *Zool. Beitr. NF* 28: 253-269.
- Storch, V., Segner, H., Junario, J. V., Duray, M. N. (1984b) Influence of nutrition on the hepatocytes of *Chanos chanos*. *Zool. Anz.* 213: 151-160.
- Streit, B. (1994) *Lexikon Ökotoxikologie*, 2. Auflage, VCH, Weinheim, pp. 1-896.
- Strmac, M., Braunbeck, T. (1999) Effects of triphenylin acetate on survival, hatching success, and liver ultrastructure of early-life stages of Zebrafish (*Danio rerio*) *Ecotox. Environ. Safety* 44: 25-39.
- Strmac, M., Braunbeck, T. (2000) Isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to discriminate between differently contaminated small river systems. *Tox. in vitro* 14: 361-377.
- Sumpter, J. P. (1995) Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* 82/83: 737-742.
- Sumpter, J.P., Jobling, S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 7): 173-178.
- Swanson, P., Suzuki, K., Kawachi, H., Dickhoff, W. W. (1991) Isolation and characterization of two choho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol. Reprod.* 44: 29-38.
- Tabira, Y., Nakai, M., Asai, D., Yakabe, Y., Tahara, Y., Shinmyozu, T., Noguchi, M., Takatsuki, M., Shimohigashi, Y. (1999) Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *Eur. J. Biochem.* 262: 240-245.
- Thibaut, R., Debrauwer, L, Rao, D., Cravedi, J.-P. (1998) Characterization of biliary metabolites of 4-n-nonylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 28(8): 745-757.
- Timbrell, J. A. (1989) *Toxikologie für Einsteiger*. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp. 1-230.
- Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillelte, L. J., Jégou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., McLachlan, J. A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkaebaek, N. E. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104(Suppl 4): 741-776.

- Tremblay, L., van der Kraak, G. (1999) comparison between the effects of the phytosterol β -sitosterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature Rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(2): 329-336.
- Trudeau, V. L., Wade, M. G., van der Kraak, G. J., Peter, R. E. (1993) Effects of 17 β -estradiol on pituitary and testicular function in male goldfish. *Can. J. Zool.* 71: 1131-1136.
- Tsuda, T., Takino, A., Kojima, M., Harada, H., Muraki, K., Tsuji, M. (2000) 4-nonylphenols and 4 tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. *Chemosphere* 41: 757-762.
- Tyler, C. R. (1991) Vitellogenesis in salmonids. In Scott, A. P., Sumpter, J. P., Kime, D. E., Rolfe, M. S. (eds.) *Proceedings: Fourth international symposium of reproductive physiology in fish.* Fish-Symp. 91, Sheffield, U. K., S. 295-299.
- Tyler, C. R., Sumpter, J. P., Kawauche, H., Swanson, R. (1991) Involvement of gonadotropin in the uptake of Vg into the vitellogenic oocytes of the rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84: 291-299.
- U. S. Environmental Protection Agency (1996) Ecological effects test guidelines. Office of prevention. Pesticides and toxic substances 850.1500. Fish life cycle toxicity. EPA 712-C-96-122. Washington DC.
- U. S. Environmental Protection Agency (1996) Ecological effects test guidelines. Office of prevention. Pesticides and toxic substances 850.1400. Fish early life-stage toxicity test. EPA 712-C-96-121. Washington DC.
- Vaillant, C., Le Guellec, C., Pakdel, F., Valotaire, Y. (1988) Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70: 284-290.
- Van Boemen, C. G., Lambert, J. G. D., Goos, H. J. T., van Oordt, P. G. W. J. (1982) Estrone and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrin.* 46: 81-92.
- Vogt, G. (1987) Monitoring of environmental pollutants such as pesticides in prawn aquaculture by histological diagnosis. *Aquaculture* 67:157-164.
- Von Westernhagen, H. (1988) Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In Hoar, W. S., Randall, D. J. (Eds.) *Physiology of developing fish. Part A. Eggs and larvae, Vol. 11.* Academic Press, San Diego, CA, 253-346.
- Vonier, P. M., Crain, D. A., McLachlan, J. A., Guillette, L. J., Arnold, S. F. (1996) Interaction of environmental chemicals with estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ. Health Perspect.* 104: 1318-1322.
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J., Brandt, I., Vethaak, A. D. (2000) Health effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30(1): 71-133.
- Wakabayashi, K. (1995) Chemoprevention by dietary dehydroepiandrosterone against promotion/progression of phase of radiation-induced mammary tumorigenesis in rats. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 54: 47-53.
- Wallace, R.A. (1985) Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: Browder, L. (ed.) *Developmental Biology.* Plenum Press, 127-177.
- Warhurst, A. M. (1995) *An environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols.* Edinburgh, London, Friends of the Earth.

- Watson, R. R., Huls, A., Arghinikuum, M., Chung, S. (1996) Dehydroepiandrosterone and diseases of aging. *Drugs Aging* 9: 274-291.
- Waxman, D. J. (1996) Role of metabolism in the activation of dehydroepiandrosterone as a peroxisome proliferator. *J. Endocrinol.* 150 (Suppl.): 129-147.
- Weis, P. (1972) Hepatic ultrastructure of two species of normal, fasted and gravid teleost fish. *Am. J. Anat.* 133: 317-332.
- Wester, P. W. (1991) Histopathological effects of the environmental pollutants β -HCH and methyl mercury on reproductive organs in freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100: 237-246.
- Wester, P. W., Canton, J. H. (1986) Histopathological study of *Oryzias latipes* after long term *b*-hexachlorocyclohexane exposure. *Aquatic Toxicol.* 9: 21-45.
- Wheeler, T. F., Heim, J. R., LaTorre, M. R., James, A. B. (1997) Massspectral characterization of p-nonylphenol isomers using high resolution capillary GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* 35: 19-30.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., Parker, M. G. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135(1): 175-182.
- Wiseman, A., Goldfarb, P. S., Ridgeway, T. J., Wiseman, H. (1999) Xenoestrogens and phytoestrogens: biomediation or biomonitoring? *Trends Biotechnol.* 17: 43.
- Wolff, M. S., Toniolo, P. G., Lee, L. W., Rivera, M., Dubin, N (1993) Bloodlevels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Nat. Cancer Inst.* 85: 648-652.
- Wu, H.-Q., Masset-Brown, J., Tweedie, D. J., Milewich, L., Frenkel, R. A., Martin-Wixtrom, C., Estabrook, R. W., Prough, R. A. (1989) Induction of microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450IVAI (P-450_{Law}) by dehydroepiandrosterone in rats: a possible peroxisomal proliferator. *Cancer Res.* 49: 2337-2343.
- Yadete, F., Arukwe, A., Goksøyr, A., Male, R. (1999) Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. *Sci. Total Environ.* 233: 201-210.
- Yamada, J., Sakuma, M., Suga, T. (1992) Induction of peroxisomal β -oxidation enzymes by dehydroepiandrosterone and its sulfate in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1160: 231-236.
- Yamamoto, T. (1953) Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *J Exp. Zool.* 123: 571-578.
- Yamamoto, T. (1958) Artificially induced sex reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* 37: 227-260.
- Yamamoto, T. (1959) The effects of estrone dosage level upon the percentage of sex reversal in genetic male (XY) of the medaka (*Oryzias latipes*). *J Exp. Zool.* 137: 227-263.
- Yamamoto, T. (1962) Hormonic factors affecting the gonadal sex differentiation in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1: 341-345.
- Yamamoto, T. (1965) Estriol induced XY females of the medaka and their progenies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 5: 527-533.
- Yamamoto, T. (1969) Sex differentiation. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. (eds.) *Fish Physiology*. Vol III – Reproduction and growth, Bioluminescence, Pigments, and Poisons. Academic Press, New York, N. Y., USA pp. 117-175.
- Yamamoto, T. (1975) *Medaka (Killifish): Biology and strains*. Keigaku Publ. Yugaku-sha, Tokyo, Japan.

- Zacharewski, T. (1998) Identification and assessment of endocrine disruptors: Limitations of *in vivo* and *in vitro* studies. *Environ. Health Perspect.* 106(2): 577-582.
- Zacharewski, T., Berhane, K., Gillesby, B. E., Burnison, B. K. (1995) Detection of estrogen and dioxin-like activity in pulp and paper mill black liquor and effluent using *in vitro* recombinant receptor-reporter gene assays. *Environ. Sci. Technol.* 29: 4140-4146.
- Zacharewski, T. R., Bondy, K. L., McDonell, P., Wu, Z. F. (1994) Antiestrogenic effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on 17 β -estradiol-induced pS2 expression. *Cancer Res.* 54: 2707-2713.
- Zahn, T., Braunbeck, T. (1995) Cytotoxic effects of sublethal concentrations of Malachite Green in isolated hepatocytes from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. in Vitro* 9 (5): 729-741.
- Zahn, T., Hauck, C., Holzschuh, J., Braunbeck, T. (1995) Acute and sublethal toxicity of seepage waters from garbage dumps to permanent cell lines and primary cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A novel approach risk assessment for chemical and chemical mixtures. *Zbl. Hyg.* 196: 455-479.
- Zellner, A., Kalbfuß, W. (1997) Belastung bayerischer Gewässer durch Nonylphenole. *Münchener Beiträge zur Abwasser, Fischerei und Flussbiologie* 50, Oldenburg Wissenschaftsverlag, München S. 55-64
- Zou, E., Fingerman, M. (1999) Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(*tert*)-octylphenol, and 2,4,5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122(1): 115-120.

11. Publikationen und Tagungsbeiträge

- Knörr, S., Bohl, M., Braunbeck, T. (1997) Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf die Entwicklung der roten und weißen Muskulatur bei juvenilen Huchen (*Hucho hucho*). Verh. Dtsch. Zool. Ges. 90.1: 365.
- 1999: Mitarbeit am Zwischenbericht für das Forschungsvorhaben 73e040100 Teilbericht II: Untersuchung zur endokrinen und Toxischen Wirkung von Nonylphenol auf Fische im Auftrag des Bayerischen Ladesamts für Wasserwirtschaft.
- 1999: Mitarbeit am Zwischenbericht für das UBA-Projekt Nr. 21602001/01: „Endokrin wirksame Substanzen in Fischen – Teststrategien zur ökotoxikologischen Prüfung.
- Knörr, S., Bohl, M., Braunbeck, T. (1999) Die Entwicklung roter und weißer Muskulatur bei juvenilen Huchen (*Hucho hucho*) unter dem Einfluß unterschiedlicher Strömung S ein Beitrag zur Optimierung der Kondition zur Ausbürgerung in natürliche Habitate. Verh. Ges. Ichthyol. 1: 109-127
- Knörr, S., Schwaiger, J., Negele, R.D., Braunbeck, T. (1999) Changes in the sex ratio and reproductive success in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after exposure to nonylphenol. Proc. 9th Annual Meeting SETAC-Europe, Leipzig: 1999, 2j/038.
- 2000: Mitarbeit am Endbericht für das Forschungsvorhaben 73e040100 Teilbericht II: Untersuchung zur endokrinen und Toxischen Wirkung von Nonylphenol auf Fische im Auftrag des Bayerischen Ladesamts für Wasserwirtschaft.
- 2000: Mitarbeit am Endbericht für das UBA-Projekt Nr. 21602001/01 „Endokrin wirksame Substanzen in Fischen – Teststrategien zur ökotoxikologischen Prüfung.
- Knörr, S.; Braunbeck, T. (2000) Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in a life cycle test with the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Proc. 10th Annual Meeting SETAC-Europe, Brighton: U. K. 3DII/p031
- Knörr, S., Bieberstein, U., Schwaiger, J., Negele, R.D.; Braunbeck, T. (2000) Effects of nonylphenol on medaka (*Oryzias latipes*) in a full life-cycle experiment. Arch. Environ. Contam. Toxicol., in prep.
- Knörr, S., Braunbeck, T. (2000) Changes in developmental parameters and sex ratio of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after exposure to octylphenol in a life-cycle experiment. Ecotox. Environ. Safety, submitted.