

### 4.4 Diskussion

Nach Belastung von RTG-2 Zellen aus der Regenbogenforelle mit acetonischen Sedimentextrakt von Krähenbach und Körsch konnte im Neutralrottest bei beiden Gewässern eine cytotoxische Wirkung festgestellt werden. Dabei induzierte der Sedimentextrakt aus der Körsch im Vergleich zum Krähenbach eine höhere Cytotoxizität. Dagegen konnten beim nativem Wasser und wäßrigem Eluat beider Bäche keine Abweichungen zur Kontrolle beobachtet werden. Um eine klare Aussage zum Belastungszustand der beiden Modellfließgewässer machen zu können, wurden weitere Untersuchungen mit den empfindlicheren isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle durchgeführt.

Befunde der Untersuchungen mit isolierten Hepatocyten ergeben folgendes Bild: Im Gegensatz zu RTG-2-Zellen mit Neutralrotretention als Endpunkt zeigten Primärhepatocyten nach Belastung mit nativem Wasser, Porenwasser, wäßrigem Sedimenteluat und acetonischen Sedimentextrakt zu allen Probenahmeterminen sowohl funktionelle als auch morphologische Effekte bei beiden Fließgewässern. Bereits nach einer Belastungsdauer von 1 d und einer 1:4 Verdünnung des nativen Wassers, Porenwassers, wäßrigem Sedimenteluates und acetonischen Sedimentextraktes waren im Vergleich zur Kontrolle zahlreiche Effekte bei beiden Modellfließgewässern zu beobachten (Strmac & Braunbeck, 1997a). Dabei induzierten die untersuchten Wasser- und Sedimentproben zeit- und dosisabhängige ultrastrukturelle Veränderungen in isolierten Hepatocyten. Weiterhin war erstaunlich, daß selbst beim nativen Wasser des Krähenbachs, der ursprünglich als unbelastetes Modellreferenzgewässer für die stärker kontaminierte Körsch ausgewählt wurde, cytologische Veränderungen in den isolierten Hepatocyten zu beobachten waren, so daß man von einer konstanten Belastung des Krähenbach-Wasser und -Sediment ausgehen muß. Diese Befunde korrelieren gut mit den chemisch-analytischen Daten (Honnen et al., 1999b).

Ein Vergleich der untersuchten Modellfließgewässer ergibt ein klares Ergebnis. Die Proben aus der Körsch verursachten ultrastrukturell, qualitativ und quantitativ stärkere Abweichungen zu den jeweiligen Kontrollzellen als die Proben aus dem Krähenbach. Ein vergleichbarer Befund konnte bereits mit den biochemischen Untersuchungen (vgl. Kapitel 4.2) ermittelt werden.

#### **Vergleich biochemischer und morphologischer Befunde**

Vergleicht man biochemische (vgl. Kapitel 4.2) und morphologische Daten untereinander, so lassen sich einige Parallelen erkennen. Die meist zu beobachtende Aktivitätszunahme der Katalase und Sauren Phosphatase nach Belastung mit Krähenbach- und Körsch-Sedimentextrakt gehen einher mit einer Vermehrung von Peroxisomen und Lysosomen. Die Zunahme der Lysosomen läßt sich dabei als unspezifische Reaktion der Hepatocyten auf Streß deuten (Rez, 1986). Weiterhin könnte die Zunahme der Aktivität der Alaninaminotransferase im Zusammenhang stehen mit einer verstärkten Einlagerung von Lipidtropfen in den isolierten Hepatocyten. Obwohl in den belasteten Zellen beider Fließgewässer meist kein Anstieg der Lipidperoxidationsrate nach Belastung mit acetonischen Sedimentextrakten zu beobachten war, läßt sich aufgrund der meist erhöhten Freisetzung der Laktatdehydrogenase ins Medium auf Schädigungen der Zellmembranen schließen. Weiterhin waren gerade bei der Körsch Sedimentprobe vom Juli 1997 zahlreiche Myelinkörper im Cytoplasma zu beobachten, ein weiteres Indiz auf Membranschädigungen in den belasteten Zellen.

#### 4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Diskussion

---

##### **Korrelationen der biochemischen und morphologischen Befunde mit vergleichbaren Studien**

Um einen Bezug für die Toxizität der Kompartimente Wasser und Sediment auf isolierte Hepatocyten zu erhalten, ist ein Vergleich mit weiteren toxikologischen Untersuchungen unerlässlich.

Ein breites Spektrum unterschiedlicher *In vivo*- und *In vitro*-Biotests wurden durchgeführt, um die Wirkung umweltrelevanter Schadstoffe bezüglich biochemischer und cytopathologischer Endpunkte zu untersuchen.

In einer parallel zur vorliegenden Studie durchgeführten *In vivo*-Untersuchung wurden Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) unter Halbfreilandbedingungen Krähenbach- und Körschwasser ausgesetzt (Triebskorn et al., 1997). Die Körschwasser exponierten Fische zeigten dabei auffällige ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber. Die häufigsten Effekte waren eine Störung bzw. Aufhebung der cytoplasmatischen Kompartimentierung in den Hepatocyten, ein Rückgang der Glykogenmenge, die Proliferation von glattem und rauhem endoplasmatischem Retikulum sowie eine verstärkte Fragmentierung, Vesikulierung und Dilatation der ER Zisternen (Triebskorn et al., 1997). Die beobachteten *In vivo*-Ergebnisse korrelieren mit den vorliegenden *In vitro*-Befunden. Somit ist eine gewisse Übertragbarkeit der ermittelten *In vitro*-Ergebnisse auf das Gesamttier gegeben. Jedoch lassen sich die beobachteten Effekte in den Hepatocyten eher als unspezifische Reaktion auf Streß deuten. Ein ausführlicher Vergleich der *In vivo*- und *In vitro*-Ergebnisse ist in den Tabellen 4.11 und 4.12 dargestellt. Weiterhin traten rein Fließgewässer-spezifische Effekte sowohl in der Leber der Bachforellen als auch in den isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle auf. Beim Krähenbach war bei beiden Testsystemen eine Zunahme des RER-Gehaltes festzustellen, während bei der Körsch eine Abnahme des RER-Gehaltes sowie der RER-Stapelbildung, dilatierte RER-Zisternen, eine Zunahme der SER-Menge und das vermehrte Auftreten von Myelinkörpern im Cytoplasma zu beobachten waren (Tab. 4.11, 4.12). Interessanterweise zeigte die Körsch sowohl *in vivo* und *in vitro* im Vergleich zum Krähenbach qualitativ und quantitativ stärkere cytopathologische Effekte in den Hepatocyten auf. Diese Befunde stimmen wiederum mit den chemisch-analytischen Daten, die eine meist konstant höhere und komplexere Schadstoffbelastung für die Körsch belegen, überein (Honnen et al., 1999b).

In Krähenbach und Körsch zeigte die chemische Analyse eine weitgehend konstante Belastung von Wasser und Sediment mit Schwermetallen (Honnen et al., 1999b). Dabei erreichten die Schwermetalle im Krähenbach Konzentrationen, die durchaus mit den Belastungswerten der Körsch vergleichbar sind. Über den gesamten Probennahmenzeitraum konnte u.a. an beiden Fließgewässern eine konstante Belastung mit Zink und Kupfer beobachtet werden (Honnen et al., 1999b).

Zahlreiche Studien untersuchten die Auswirkungen von Schwermetallen wie Kupfer, Cadmium und Quecksilber auf Fische. Einen Anstieg der Laktatdehydrogenaseaktivität in der Leber bzw. im Plasma konnten Gill et al. (1992) *in vitro* beim Prachtbarben (*Puntius conchonius*) und Christensen et al. (1972) *in vivo* beim Katzenwels (*Ictalurus nebulosus*) nach einer Belastung mit Kupfer beobachten. In einer *In vivo*-Studie mit dem Schlangenkopffisch (*Channa punctatus*) induzierte Kupfer in Konzentrationen von 0,05 - 0,1 mg/L zahlreiche ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber. Die belasteten Hepatocyten zeigten eine auffällige Kondensation von Heterochromatin, geschwollene Mitochondrien mit aufgelösten Cristae, dilatierte und vesikulierte RER-Zisternen sowie eine Proliferation von SER und Lysosomen (Khangarot, 1992). Diese cytopathologischen Veränderungen stimmen mit den eigenen Befunden überein, besitzen aber eher unspezifischen Charakter (vgl. Kapitel 4.3).

## 4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Diskussion

Tab. 4.11: Vergleich cytopathologischer Effekte, die in der Leber von Bachforellen und isolierten Hepatocytten der Regenbogenforelle nach Belastung mit Krähenbach- und Körschwasser gefunden wurden (Probennahmen Juli 1996, 1997, 1998).

	<i>In vitro</i> Krähenbach	<i>In vivo</i> Krähenbach	<i>In vitro</i> Körsch	<i>In vivo</i> Körsch	
<b>Abnahme der Kompartimentierung</b>					
<b>Kern</b>					
Veränderte Kernform					
Dilatation der Kernhülle					
Heterochromatin Zunahme					
Marginalisierung von Heterochromatin					
Kerneinschlüsse					
Abnahme der Nucleolanzahl					
Lagaveränderung des Kernes					
<b>Mitochondrien</b>					
Erhöhte Heterogenität					
Auflösung der Cristae					
Akkumulationen					
Assoziation mit ER-Zisternen					
Assoziation mit Peroxisomen					
<b>RER</b>					
Abnahme der RER-Menge					
Zunahme der RER-Menge					
Abnahme der Stapelbildung					
Dilatation					
Vesikulierung					
<b>SER</b>					
Zunahme der SER-Menge					
<b>Golgi-Felder</b>					
Dilatation der Zisternen					
Fenestrierung					
Zunahme der Aktivität					
Abnahme der Aktivität					
<b>Lysosomen</b>					
Zunahme von Lysosomen					
Myelinkörper					
Multivesikuläre Körper					
Vakuolen					
<b>Peroxisomen</b>					
Zunahme von Peroxisomen					
Akkumulationen					
<b>Lipid</b>					
Zunahme					
<b>Glykogen</b>					
Abnahme der Glykogen Menge					

*In vivo*-Daten aus Tribskorn et al., 1997.

#### 4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Diskussion

Tab. 4.12: Vergleich cytopathologischer Effekte, die in der Leber von Bachforellen und isolierten Hepatocytten der Regenbogenforelle nach Belastung mit acetonischem Sedimentextrakt aus Krähenbach und Körsch gefunden wurden (Probennahmen Juli 1996, 1997, 1998).

	<i>In vitro</i> Krähenbach	<i>In vivo</i> Krähenbach	<i>In vitro</i> Körsch	<i>In vivo</i> Körsch
<b>Abnahme der Kompartimentierung</b>				
<b>Kern</b>				
Veränderte Kernform				
Dilatation der Kernhülle				
Heterochromatin Zunahme				
Marginalisierung von Heterochromatin				
Kerneinschlüsse				
Abnahme der Nucleolanzahl				
Zunahme der Nucleolanzahl				
Lageveränderung des Kernes				
<b>Mitochondrien</b>				
Erhöhte Heterogenität				
Auflösung der Cristae				
Akkumulationen				
Assoziation mit ER-Zisternen				
Assoziation mit Peroxisomen				
Myelinkumulation				
<b>RER</b>				
Abnahme der RER-Menge				
Zunahme der RER-Menge				
Abnahme der Stapelbildung				
Dilatation				
Vesikulierung				
<b>SER</b>				
Zunahme der SER-Menge				
<b>Golgi-Felder</b>				
Dilatation der Zisternen				
Fenestrierung				
Langgestreckte Zisternen				
Zunahme der Aktivität				
Abnahme der Aktivität				
<b>Lysosomen</b>				
Zunahme von Lysosomen				
Myelinkörper				
Myelinkumulationen an Lipid				
Vakuolen				
<b>Peroxisomen</b>				
Zunahme von Peroxisomen				
Akkumulationen				
<b>Lipid</b>				
Zunahme				
<b>Glykogen</b>				
Abnahme der Glykogen Menge				

*In vivo*-Daten aus Triebkorn et al., 1997.

#### 4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Diskussion

---

Besonders nach einer Belastung mit Korsch-Sedimentextrakt war eine deutliche Vesikulierung und Dilatation des RER zu beobachten. Halbreich und Mayer (1969) vermuten, daß die Ursachen für Vesikulierung und Dilatation des RER im Ausbleiben der Erneuerung von Membrankomponenten aufgrund einer chemisch toxikologisch bedingten Inhibition der Synthese von Phospholipiden und Proteinen zu suchen ist.

Neben Schwermetallen konnten in beiden Fließgewässern zahlreiche PAHs und PCBs nachgewiesen werden (Honnen et al., 1999b). Von PCBs ist bekannt, daß sie beim Fisch in der Leber akkumulieren (Melancon & Lech, 1976) und nach Induktion der Biotransformationsenzyme metabolisiert werden (Lidmann et al., 1976; Hill et al., 1976; Lipsky et al., 1978). Hinton et al. (1978) und Klaunig et al. (1979) konnten ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber des Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) nach Exposition mit PCBs beobachten. Weiterhin zeigten die PCB-belasteten Hepatocyten ein verstärktes Auftreten von Lipidtröpfen. Im Vergleich dazu traten auch in den mit nativem Wasser und Sedimentextrakt belasteten isolierten Hepatocyten, vor allem bei der Korsch, vermehrt Lipidtröpfen im Cytoplasma auf. Einen ähnlichen Anstieg des Lipidgehaltes konnte in Hepatocyten von wild cotton-Ratten nach Belastung mit einem PCB kontaminierten Lebensraum festgestellt werden (Elangbam et al., 1991). Zahlreiche Untersuchungen an unterschiedlichen Species ergaben nach PCB-Belastung ultrastrukturelle Effekte *in vivo* und *in vitro* auf Hepatocyten. Thomé et al. (1995) wiesen in kultivierten foetalen Hepatocyten eine Reihe von ultrastrukturellen Veränderungen der Organellen nach. Neben einer Proliferation des RER, dem Auftreten von cytoplasmatischen Lücken mit dichten konzentrischen Membranstapeln waren drastische Effekte in den mitochondrialen Cristae, eine Zunahme von Lipidtröpfen mit paralleler Entleerung der Glykogenspeicher zu beobachten (Thomé et al., 1995). Ähnliche Effekte fanden auch Singh und Gilroy (1997) in der Leber von mit PCB 105 gefütterten Sprague-Dawley-Ratten wie eine Proliferation des SER, veränderte mitochondriale Cristae, Abnahme der RER-Menge, Reduktion des Glykogens, Zunahme von Lipidtröpfen sowie eine Vermehrung von Peroxisomen. Williams et al. (1993) wiesen darauf hin, daß unabhängig von der zu untersuchenden Spezies, die Hepatocyten qualitativ ähnliche morphologische Veränderungen nach PCB Belastung aufzeigten. Die PCB induzierten Effekte beinhalteten irregulär geformte Mitochondrien, welche dicht gedrängt und sehr oft eng mit ER-Zisternen assoziiert waren. Die Menge an RER nahm ab und ihre Zisternen waren zunehmend dilatiert. Zudem nahm die Anzahl von Lysosomen und Residualkörpern parallel zu einer Akkumulation von Lipid stark zu.

Neben PCBs werden Biotransformationsenzyme auch durch PAHs induziert. Vigano et al. (1994) berichteten, daß PCB- und PAH-kontaminierte Bereiche des Flußes Po Biotransformationsenzyme in der Leber der Regenbogenforelle aktivierten. Weitere Untersuchungen an belasteten Meeräschen (*Mugil sp.*) aus PAH kontaminierten Regionen Spaniens zeigten verstärkte Aktivitäten der Katalase und Glutathion S-Transferase (Rodriguez-Ariza et al. 1993). Im Vergleich zu diesen Ergebnissen waren in den mit Krähenbach und Korsch belasteten isolierten Hepatocyten ebenfalls ein Anstieg der Glutathion S-Transferase und der Katalase zu beobachten.

Eine Vielzahl von Untersuchungen berichteten von einer Induktion der Antioxidationsenzyme in Fischen nach Belastung mit kontaminierten Sedimenten bzw. Fischen aus verunreinigten Regionen. Livingstone et al. (1992) fanden in der Nordsee gefangenen Kliesche (*Limanda limanda*) eine erhöhte Aktivität der Katalase. Ähnliche Befunde wurden nach Belastung von Klieschen mit kontaminierten Sediment in einer Laborstudie (Livingstone et al., 1993) erzielt. Beim Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) war nach einer Belastung mit Abwasser aus Färbemühlen ein signifikanter Anstieg der Katalaseaktivität festzustellen (Mather-Mihaich & Di Giulio, 1991).

#### 4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Diskussion

---

Schließlich wurden im Wasser und Sediment des Krähenbach und Körsch zahlreiche Pestizide gefunden. Vor allem die Körsch zeigte im Vergleich zum Krähenbach eine verstärkte Kontamination mit Pestiziden wie Atrazin, Lindan, Endosulfan, DDT, DDE, Pentachlorphenol u.a. (Honnen et al., 1999b).

Atrazin konnte im Oberflächenwasser der Körsch nachgewiesen werden und ist eines der am meisten verbreitetsten Herbizide mit besonderer Beständigkeit und Verbreitung in Boden und Wasser (Rippen, 1994; Schiavon, 1988; Wilson et al., 1987). Eine ultrastrukturelle Untersuchung der Niere nach subletaler Belastung von Regenbogenforellen mit Atrazin ergaben unterschiedliche cytopathologische Veränderungen wie Proliferation des SER, die Ausbildung ring- und kelchförmiger Mitochondrien, Vermehrung von Peroxisomen sowie eine Vakuolisierung des Cytoplasmas (Oulmi et al., 1995b). Vergleichbare Effekte wie Proliferation des SER, Zunahme von Peroxisomen und Vakuolen waren auch in der vorliegenden Studie zu beobachten. Neskovic et al. (1993) berichteten von gestörten Funktionen der Leber, Effekte im Gewebe sowie Veränderungen der Enzymaktivitäten beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) nach Belastung mit Atrazin. In einer *In vitro*-Studie mit isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) zeigten die mit Atrazin belasteten Zellen unterschiedliche cytopathologische und biochemische Veränderungen (Zahn, 1995). Besonders die Aktivitäten der Alaninaminotransferase und Glutathion S-Transferase stiegen signifikant an. Einen vergleichbaren Aktivitätsanstieg dieser beiden Enzyme war auch in mit nativem Wasser des Krähenbachs und der Körsch exponierten isolierten Hepatocyten zu finden.

Die Analyse der cytopathologischen Befunde der mit nativem Wasser, Porenwasser, wäßrigen Sedimenteluat und acetonischen Sedimentextrakt belasteten isolierten Hepatocyten zeigt, daß alle untersuchten Kompartimente sowohl vom Krähenbach als auch von der Körsch zu allen Probennahmeterminen das ultrastrukturelle Bild der Zellen im Vergleich zur Kontrolle bereits nach 1 d Belastung beeinflußt hat. Dabei konnte festgestellt werden, daß zahlreiche cytopathologische Veränderungen in den Krähenbach und Körsch Wasser- und Sedimentproben belasteten Primärhepatocyten sich zum Teil zwischen den einzelnen Probennahmen sowie Fließgewässer- und Kompartiment übergreifend unterschieden bzw. wiederholten. Einige der beobachteten Effekte waren krähenbach- bzw. körschspezifisch (Tab. 4.13). Die meisten angeführten cytopathologischen Effekte in den belasteten Primärhepatocyten der vorliegenden Studie weisen auf nekrotische Veränderungen hin. Jedoch konnten auch apoptotische Symptome wie Kondensierung des Heterochromatins, Schädigung des Cytoskeletts (Schwartzmann & Cidlowski, 1993) und Fragmentierung der DNA (McKelvey-Martin et al., 1993; Fairbairn et al., 1995) mittels des Comet-Assay (vgl. Kapitel 6) vor allem nach Belastung der Zellen mit Körsch-Umweltproben nachgewiesen werden. Studien mit genotoxischen Chemikalien zeigten, daß diese direkt oder indirekt mit regulatorischen Signalen der Zelle interferieren und somit Apoptose induzieren können (Ronen & Hedle, 1984).

Die vorliegenden biochemischen und cytopathologischen Ergebnisse zeigen eine hohe Korrelation mit den chemisch-analytischen Daten, die einerseits zwischen den Modellfließgewässern und den Kompartimenten Wasser und Sediment während des Untersuchungszeitraums von 1996 - 1998 jahreszeitliche Unterschiede zwischen den einzelnen Probennahmen im quantitativen und qualitativen Schadstoffpotential der einzelnen Fließgewässern aufzeigten.

Es zeigte sich weiterhin, daß biochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen an Primärhepatocyten geeignete Methoden sind, das Schadstoffpotential nicht nur von kontaminiertem Wasser sondern auch von Sediment zu ermitteln und zu charakterisieren. Während bei *In vivo*-Untersuchungen eine große Anzahl von Versuchsfischen eingesetzt werden muß und viele äußere Faktoren bei Frei-

#### 4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Diskussion

landversuchen wie Jahreszeit, Temperaturschwankungen, Handling beim Fangen, Hochwasser und parasitärer Befall die Ergebnisse beeinflussen können, sind für *In vitro*-Tests wie in der vorliegenden Arbeit nur wenige Spendertiere nötig, und eine Beeinträchtigung der Versuche durch äußere Faktoren ist nicht gegeben. Schließlich ist der zeitliche, personelle und finanzielle Aufwand bei *In vitro*-Tests im Vergleich zu *In vivo*-Versuchen weit geringer.

Tab. 4.13: Zusammenfassung krähenbach- und körschspezifischer, cytopathologischer Veränderungen nach Belastung mit Wasser- und Sedimentproben.

Umweltprobe	Krähenbach	Körsch
natives Wasser		Veränderte Zellform Veränderte Kernform Kerneinschlüsse
Porenwasser	Vermehrung der Dictyosomenanzahl Dictyosomen mit langgestreckten Zisternen	Kerneinschlüsse Akkumulation von Mitochondrien Abnahme des RER-Gehaltes
wäßriges Sedimenteluat		Veränderte Zellform Lageveränderung des Kernes Kerneinschlüsse Vermehrung von Nucleoli Myelinakkumulationen an Mitochondrien
acetonisches Sedimentextrakt	Dictyosomen mit langgestreckten Zisternen	Kerneinschlüsse Vermehrung von Nucleoli Myelinakkumulationen an Lipid-tropfen Proteinkristalle

Die ermittelten Befunde der vorliegenden Arbeit können unter dem Aspekt gesehen werden, daß die Daten jeweils auf Momentaufnahmen beruhen, während sich die zeitliche und örtliche Zusammensetzung der Wasser- bzw. Sedimentproben in den untersuchten Gewässern innerhalb kürzester Zeiträume bzw. auf kleinstem Raum ändern können.

#### **4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Diskussion**

---