

4. Cytologische Effekte von Wasser und Sediment in isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Zusammenfassung: Um die Wirkung von Wasser- und Sedimentproben zweier unterschiedlich stark belasteter Modellfließgewässer (Krähenbach, Körsch) auf Fischhepatocyten zu untersuchen, wurden isolierte Hepatocyten der Regenbogenforelle mit 1:3 bzw. 1:2 und 1:4 Verdünnungen von nativem Wasser, Porenwasser, wäßrigen Sedimenteluat und acetonischen Sedimentextrakt beider Gewässer für 48 h exponiert. Die Hepatocyten wurden auf cytopathologische (Elektronenmikroskopie) sowie biochemische (Stoffwechsel- und Biotransformationsenzyme, Lipidperoxidation) Veränderungen untersucht. Bereits nach 1 d Belastungsdauer und einer 1:4 Verdünnung des nativen Wassers, Porenwassers, wäßrigen und acetonischen Sedimentextraktes waren bei beiden Fließgewässern zahlreiche biochemische und ultrastrukturelle Effekte zu beobachten. Dabei verursachten die Umweltproben aus der Körsch sowohl biochemisch als auch ultrastrukturell stärkere Abweichungen zu den Kontrollzellen, als die Proben aus dem Krähenbach. Die Befunde belegen die Eignung isolierter Hepatocyten als hochempfindliches Werkzeug, mit den ausgewählten cytologischen Endpunkten das Schadstoffpotential auch gering belasteter Umweltproben nachzuweisen.

4.1 Einleitung

Prinzipiell sind Dauerzelllinien (z.B. RTG-2) aus Fischen (vgl. Kapitel 3) für eine schnelle Abschätzung der akuten Toxizität der verschiedenen Kompartimente von Fließgewässern geeignet. Jedoch sind Gewässer oft nur mit sehr geringen Konzentrationen diverser Schadstoffe belastet, so daß die verwendeten Fibrocyten keine akut cytotoxische Reaktion auf Wasser- bzw. Sedimentproben zeigen. Weiterhin ist ihr Reaktionsmuster auf verschiedene Schadstoffgruppen wenig spezifisch. Deshalb wurden weitere Untersuchungen mit einem sensitiveren Testsystem sowie biochemischen und ultrastrukturellen Endpunkten durchgeführt.

Um zu einer näheren Eingrenzung cytologischer Reaktionen im subletalen Bereich auf die komplexen Matrices Wasser und Sediment zu gelangen, sollen in den folgenden Kapiteln Untersuchungen an Primärzellkulturen aus der Leber der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) vorgestellt werden. Der Vorteil von Primärzellkulturen von Hepatocyten gegenüber permanenten Fischzelllinien besteht vor allem in der erhöhten Empfindlichkeit der Hepatocyten und der Tatsache, daß der Stoffwechsel von isolierten Leberzellen dem des intakten Tieres sehr viel näher kommt als jener der teilweise stark dedifferenzierten Dauerzelllinien (Braunbeck, 1995).

Primärzellkulturen werden schon seit einigen Jahrzehnten für unterschiedliche Fragestellungen verwendet. Ihre Etablierung erfolgte zunächst an der Ratte (Baksi & Frazier, 1990; Berry & Friend, 1969; Billings et al., 1977; Bissell & Guzelian, 1979; Eaton & Klaassen, 1979; Friedman et al., 1981; Guzelian et al., 1977; Harris & Cornell, 1983), Hühnern (Roux et al., 1978) später an verschiedenen Fischarten (Baksi & Frazier, 1988; Birnbaum et al., 1976; Blair et al., 1990; Brighenti et al., 1987; Gagné et al., 1990; Janssen & Lowrey, 1987; Klaunig, 1984; Klaunig et al., 1985; Lipsky et al., 1986; Moerland & Sidell, 1981; Mommsen, 1985; Moon et al., 1985). Primärzellkulturen wurden vor allem für biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Pharmazeutika und Hormonen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach der Zweistufen-Perfusion

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

nach Seglen (1972, 1976) in modifizierter Form gewonnen (Braunbeck & Storch, 1992; Zahn et al., 1995) und für toxikologische Tests benutzt. Die isolierten Hepatocyten wurden mit nativem Wasser, Porenwasser, wäßrigen Sedimenteluat, acetonischen Sedimentextrakt und verschiedenen Schadstoffgemischen (vgl. Kapitel 5) belastet und auf biochemische, morphologische und gentoxische Endpunkte hin untersucht. Für eine Bewertung der Belastung von Wasser, Sedimenten und Schwebstoffen sind biologische Wirkungstests geeignet und notwendig, um summarisch die Wirkung aller Inhaltsstoffe zu erfassen sowie deren synergistische und antagonistische Effekte (Verstärkung oder Reduzierung der toxischen Wirkung von Stoffgemischen) und Metabolisierung im Organismus (Toxifizierung und Detoxifizierung) zu berücksichtigen (Gunkel, 1994).

Da Schadstoffe je nach ihren chemischen Eigenschaften an Schwebstoffe adsorbieren bzw. im Wasserkörper verbleiben, ist eine unterschiedliche Belastung von Fließgewässer Kompartimenten zu erwarten, so daß neben nativen Wasser auch Sediment in Biotests berücksichtigt werden muß. Native Sediment- oder Schwebstoffproben können nicht auf Zellen gegeben werden, deshalb ist es bei vielen *In vitro*-Testverfahren notwendig, die partikelgebundenen Schadstoffe durch verschiedene Verfahrensweisen in die gelöste Phase zu überführen (Ahlf, 1995; Ahlf et al., 1991; Burton, 1991; Burton & Mac Pherson 1995; Hollert & Braunbeck, 1997; Liss & Ahlf, 1997). Im folgenden sollen Verfahrensweisen zur Remobilisierung partikelgebundener Schadstoffe vorgestellt werden.

- (1) Dem *nativen Porenwasser* sind viele aquatische Organismen *a priori* ausgesetzt und stellt den Hauptexpositionspfad von Sedimentschadstoffen dar (Burton, 1991; Power & Chapman, 1992). Porenwasser sollte zu Untersuchungen von Schädigung benthosbewohnender Organismen durch Sedimente herangezogen werden. Die HABAB-WSV (BFG, 1997) benutzt die ökotoxikologische Wirkung von Porenwasser im Leuchtbakterien-, Algen-, und Daphnientest als wichtiges Kriterium für Baggergutumlagerungen: "Baggergut, dessen Porenwasser bei einer Verdünnung 1:4 nicht toxisch wirkt, darf umgelagert werden." Aufgrund der geringen Volumina ist Porenwasser nur für wenige Biotests verwendbar.
- (2) Der Einsatz von *wäßrigen Eluaten* von Sedimenten in Biotests ahmt oxidierende Umweltverhältnisse nach, wie sie bei einer Remobilisierung von Sedimenten in die Wassersäule zu erwarten sind (Ahlf et al., 1991). Jedoch ist aus vorangehenden Studien bekannt, daß sie das tatsächlich bioverfügbare Maß an Schadstoffen unterbewerten (Harkey et al., 1994).
- (3) Organische Sedimentextrakte werden durch Extraktion von Sediment mit organischen Lösungsmitteln wie etwa Aceton hergestellt (Campbell et al., 1992; Ho & Quinn, 1993; Landolt & Kocan, 1984; True & Heyward, 1990). Mit organischen Extrakten wird versucht, eine langfristige Schädigung von Organismen durch überwiegend lipophile Substanzen über eine kurze Exposition mit den potentiell verfügbaren Schadstoffen nachzuahmen. Jedoch ist dieser Ansatz in der ökotoxikologischen Literatur umstritten (Braunbeck et al., 1995).

Eine möglichst detaillierte Charakterisierung des Schadstoffpotentials von Sedimenten läßt sich über den Einsatz verschiedener Expositionsphasen in mehreren Biotests erhalten. Eine alleinige Verwendung eines Biotestverfahrens kann das Schädigungspotential von Wasser bzw. Sedimenten nicht ausreichend beschreiben (Zimmer & Ahlf, 1994). Deshalb ist bei der Bewertung von Fließgewässerbelastungen eine Kombination verschiedener Biotests zum Erhalt einer Vielzahl von Informationen über die Toxizität sinnvoll. Da neben einer akut toxischen Wirkung wassergelöster und sedimentgebundener Schadstoffe auf Organismen und Zellen gerade subletale Veränderungen gravierende ökologische Auswirkungen wie erbgutverändernde, morphologische, endokrine und

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment

teratogene Effekte bewirken können, sollten für eine umfassende toxikologische Charakterisierung verschiedene spezifische Endpunkte eingesetzt werden (Hollert & Braunbeck, 1997).

In der vorliegenden Arbeit sollen die ermittelten Befunde miteinander und mit Ergebnissen aus *In vivo*-Versuchen verglichen werden. Eine Charakterisierung und Bewertung der Belastung des Gefährdungspotentials der beiden Modellfließgewässer und ihrer Kompartimente soll im Vergleich mit Daten der chemischen Analytik vorgenommen werden.

Die Bereitstellung von Daten zur Wirkung komplexer Schadstoffgemische aus Freilandproben und definierten Schadstoffcocktails auf isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle sollen die Eignung von Primärzellkulturen für Toxizitätsuntersuchungen von Umweltproben bewerten. Durch den Vergleich mit *In vivo*-Versuchen soll eine mögliche Übertragbarkeit von *In vivo*- zu *In vitro*-Versuchen geprüft werden.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment
