

4.2 Biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Wasser und Sediment der beiden Modellfließgewässer Krähenbach und Körsch auf isolierte Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Zusammenfassung: *Isolierte Hepatocyten der Regenbogenforelle wurden für 48 h mit unterschiedlichen Verdünnungen von nativen Wasser, Porenwasser, wäßrigen Sedimenteluat und acetonischen Sedimentextrakt des Krähenbach und der Körsch belastet und es wurden die Aktivitäten ausgewählter Stoffwechsel- und Biotransformationsenzyme sowie die Lipidperoxidationsrate gemessen. Dabei zeigte sich zu den meisten Probennahmen sowohl bei mit Wasser als auch mit Sediment belasteten Hepatocyten bereits nach einer Belastungsdauer von 1 d eine z.T. signifikante Differenz in den Aktivitäten der erfaßten Leitenzyme sowie der Lipidperoxidationsrate. Auffällig war die meist stärkere Reaktion bei den Körsch-Proben exponierten Hepatocyten.*

In dem vorangehenden Kapitel 3 konnte eine erste Abschätzung des cytotoxischen Potentials der verschiedenen Kompartimente der beiden Modellfließgewässer mit Hilfe der Fischzelllinie RTG-2 durchgeführt werden. Jedoch zeigten die eingesetzten Dauerzellen nur nach Exposition gegen acetonischen Sedimentextrakt eine zelluläre Reaktion im Neutralrottest, obwohl chemisch-analytische Untersuchungen (Honnen et al., 1999b) Hinweise auf eine komplexe Schadstoffbelastung auch des Wasserkörpers lieferten. Deswegen wurde in der nächsten Untersuchungsstufe ein empfindlicheres Testsystem ausgewählt, um das cytologische Reaktionsmuster von Zellkulturen, das auch durch geringe Konzentrationen komplexer Schadstoffgemische verursacht werden kann, nachzuweisen.

Allgemein wird in isolierten Zellen die Aufrechterhaltung der Aktivitäten von Enzymen als Gütekriterium betrachtet (Berry et al., 1991). Schadstoffbedingte Aktivitätsänderungen von Stoffwechsel- und Biotransformationsenzymen in isolierten Zellen können als toxische Effekte angesehen und zur Bewertung der Belastung von Umweltproben wie Wasser und Sediment herangezogen werden.

Da der Wirkungsmechanismus von Schadstoffen in Zellen funktionell auf molekularer Ebene zu suchen ist, werden in diesem Kapitel Untersuchungen zu Veränderungen ausgewählter Enzyme und Lipidperoxidationsrate in Primärhepatocyten der Regenbogenforelle nach 48 h Exposition mit 1:3, 1:2 und 1:4 Verdünnungen von nativem Wasser, Porenwasser, wäßrigen Sedimenteluat und acetonischen Sedimentextrakt der Modellfließgewässer Krähenbach und Körsch durchgeführt. Dazu wurden im Zeitraum von November 1995 - Juli 1998 wiederholt Wasser- und Sedimentproben den beiden Fließgewässern entnommen, aufgearbeitet und im Biotest untersucht. Im folgenden werden exemplarisch die Befunde der Probennahmen vom November 1995, Juli 1996, Juli 1997, November 1997 und Juli 1998 dargestellt.

4.2.1 Biochemische Untersuchungen zur Wirkung von nativem Wasser auf isolierte Hepatocyten (Tab. 4.1, 4.2)

Cytoplasma. Nach 1 und 2 d Belastung induzierte natives Wasser aus beiden Bächen zeitabhängige und signifikante Abweichungen der cytosolischen und freigesetzten Laktatdehydrogenase zu allen Probennahme-Zeitpunkten (Tab. 4.1, 4.2). Die Aktivität der cytosolischen und freigesetzten Laktatdehydrogenase nahm nach Belastung mit Körschwasser im Vergleich zum Krähenbach meist stärker zu (Tab. 4.1, 4.2). Dagegen sank die Aktivität der freigesetzten Laktatdehydrogenase beim Krähenbach

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

Tab. 4.1: Relative Enzymaktivitäten in isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) nach Belastung mit nativem Krähenbach- und Körschwasser (Probennahmen November 1995 und Juli 1996).

| 1 Tag (Probennahme November 1995) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
|---|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 143,7 ± 1,6 ** | 108,5 ± 2,3 *** | 175,8 ± 2,6 * | 148,2 ± 0,9 |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 108,7 ± 6,1 | 107 ± 7,3 | 189,9 ± 7 | 205,2 ± 1,6 |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 81,9 ± 2,9 ** | 98,4 ± 2,7 | 76,4 ± 3,9 *** | 73,4 ± 5,8 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 9,5 ± 10,2 *** | 83,8 ± 4,1 *** | 124,6 ± 9,2 ** | 99,4 ± 6,1 |
| Esterase (mU/mg Protein) | 97,4 ± 8,6 | 89,2 ± 6,9 | 160 ± 1,3 *** | 147,7 ± 5,5 |
| Katalase (BU/mL) | 100 ± 6,6 | 100 ± 13,3 | 266,6 ± 15 * | 306,6 ± 2,1 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 123,7 ± 8,1 * | 97,8 ± 2,4 | 133,1 ± 2,5 | 118,9 ± 6,6 ** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 55,9 ± 14,8 * | 53,5 ± 15,5 ** | 92,8 ± 11,5 | 61,9 ± 23 |
| 2 Tag (Probennahme November 1995) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 171,6 ± 4,3 | 183,8 ± 2,6 | 213,6 ± 1,7 *** | 151,7 ± 9,1 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 352 ± 4,2 | 271,5 ± 6,4 | 3184,4 ± 2,5 *** | 2042,2 ± 7,7 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 113,6 ± 1,7 | 109,1 ± 5,9 * | 650,3 ± 10,1 *** | 200,9 ± 6,6 *** |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 126,6 ± 4,3 *** | 111,9 ± 4,9 *** | 43 ± 2,7 *** | 84 ± 20,8 *** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 61,9 ± 9,1 | 68 ± 3,4 | 222,1 ± 0,1 *** | 228,9 ± 7,8 |
| Katalase (BU/mL) | 128,5 ± 16,6 | 92,8 ± 0,7 | 2614,2 ± 11,7 *** | 457,1 ± 1,5 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 110,5 ± 1,6 | 127,4 ± 2,8 *** | 168,1 ± 1,6 *** | 120,1 ± 2,4 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 140,6 ± 6 | 74,5 ± 25 | 1435,5 ± 42 | 201,6 ± 19,3 |
| 1 Tag (Probennahme Juli 1996) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 83,9 ± 5,7 ** | 79,8 ± 0,4 *** | 188,7 ± 2,7 ** | 144 ± 0,8 |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 92,4 ± 4,3 | 45,7 ± 9,7 * | 190,9 ± 7,8 | 149,9 ± 7,8 |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 73,2 ± 1,3 | 73,8 ± 10,6 *** | 111,5 ± 3,6 *** | 74,7 ± 1,3 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 62,6 ± 8,1 | 62,4 ± 4,1 ** | 121,8 ± 6,2 *** | 109,3 ± 4,1 ** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 134,8 ± 5 | 103,8 ± 29,2 | 162,2 ± 4,8 | 186,5 ± 1,2 *** |
| Katalase (BU/mL) | 113,3 ± 5,8 * | 146,6 ± 9 | 260 ± 10,2 * | 100 ± 13,3 |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 109,4 ± 1,5 | 76,9 ± 4,2 | 140,6 ± 0,2 | 119,3 ± 1,3 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 48,8 ± 12,1 * | 67,8 ± 26,3 * | 98,8 ± 39,7 | 46,4 ± 5,1 |
| 2 Tag (Probennahme Juli 1996) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 212,8 ± 2 *** | 379,4 ± 5,4 *** | 341,3 ± 2,5 *** | 383,3 ± 3,5 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 588,2 ± 7,8 | 1477,4 ± 7 ** | 1127,8 ± 8,7 ** | 2006,6 ± 5,9 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 105,9 ± 4 | 141,8 ± 17,6 | 214,3 ± 7,5 *** | 126,3 ± 6,1 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 29,9 ± 1 *** | 238 ± 9,7 | 2,7 ± 16,7 *** | 262,7 ± 4 ** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 67,9 ± 0,9 *** | 75,6 ± 1,4 *** | 135,8 ± 0,9 *** | 79,6 ± 2 *** |
| Katalase (BU/mL) | 121,4 ± 5,8 | 207,1 ± 3,4 *** | 1435,7 ± 6,4 ** | 428,5 ± 0,1 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 147,2 ± 0,7 *** | 250,8 ± 5,1 *** | 228 ± 1,2 | 255,7 ± 2,4 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 100 ± 0,3 | 181,3 ± 31,7 | 400 ± 29,2 | 123,7 ± 15 |

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

Tab. 4.2: Relative Enzymaktivitäten in isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) nach Belastung mit nativem Krähenbach- und Körschwasser (Probennahmen Juli 1997 und November 1997).

| 1 Tag (Probennahme Juli 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 81,9 ± 1,2 *** | 94,8 ± 2,5 | 84 ± 2,2 *** | 64,3 ± 2,2 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 52,7 ± 12,3 | 105,8 ± 3,6 | 55,4 ± 5,4 ** | 55,1 ± 4,2 * |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 127,1 ± 0,1 *** | 109,8 ± 12,3 | 57,3 ± 0,2 *** | 121 ± 25 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 84,9 ± 7,1 ** | 111,8 ± 4,9 * | 100,8 ± 4,2 | 74,4 ± 7,6 * |
| Katalase (BU/mL) | 182,8 ± 0,7 *** | 167,1 ± 0,7 * | 68,4 ± 1,9 *** | 214,4 ± 1,2 * |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 116 ± 2,1 *** | 120,1 ± 4,9 *** | 112 ± 2,6 *** | 92,8 ± 4,9 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 137,2 ± 33,3 | 121,9 ± 37,5 | 43,2 ± 12,2 ** | 156 ± 10,9 * |
| 2 Tag (Probennahme Juli 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 113,9 ± 5,1 * | 100,6 ± 1,4 * | 116,4 ± 5,5 *** | 142,3 ± 5,1 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 253,9 ± 8,6 *** | 147,3 ± 5,2 *** | 236 ± 13,2 * | 339,9 ± 2,7 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 117,3 ± 8,6 | 124,2 ± 10,1 | 85,3 ± 10,1 | 238 ± 25,1 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 106 ± 9,8 | 96,2 ± 0,2 | 120,1 ± 5,4 ** | 88,9 ± 10,1 ** |
| Katalase (BU/mL) | 138,5 ± 1 ** | 178,5 ± 0,1 *** | 125,7 ± 0,1 *** | 481,4 ± 0,1 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 93,1 ± 2,6 | 98,8 ± 1,8 | 100,6 ± 4,4 | 85,8 ± 8,3 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 146 ± 0,8 * | 199,1 ± 3,3 ** | 164 ± 17,8 * | 523 ± 5,1 *** |
| 1 Tag (Probennahme November 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 111,2 ± 4,7 * | 111,5 ± 1,6 ** | 105,3 ± 2,9 | 134,6 ± 1 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 149,1 ± 8,6 * | 135 ± 8,6 | 419,2 ± 4,2 *** | 141,2 ± 0,1 ** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 102,6 ± 17,3 | 136,1 ± 0,1 *** | 125,8 ± 21,6 | 133,5 ± 0,1 *** |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 109,9 ± 6,6 | 119,4 ± 2,2 * | 107,1 ± 5,4 | 141,9 ± 7,5 ** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 99,6 ± 5 | 82,1 ± 5,9 * | 114,5 ± 5,4 * | 117,6 ± 0,1 ** |
| Katalase (BU/mL) | 155 ± 0,1 ** | 175 ± 1,4 ** | 240 ± 0,1 *** | 187,5 ± 1,3 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 85,5 ± 6 | 120,9 ± 3,1 * | 78,6 ± 8,9 | 97,3 ± 5,8 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 196,1 ± 9,3 * | 192,5 ± 5,4 ** | 287,5 ± 14,7 ** | 164,4 ± 8,7 * |
| 2 Tag (Probennahme November 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 106,4 ± 1,9 | 110,8 ± 2,3 | 161,2 ± 6,1 * | 113,6 ± 4,3 |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 58,7 ± 1,9 ** | 50,5 ± 7,8 * | 165 ± 9 * | 99,2 ± 5,5 |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 120,1 ± 0,1 * | 141,6 ± 17,3 * | 207,4 ± 17,3 ** | 746,7 ± 1,7 *** |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 109,4 ± 8,2 | 123,3 ± 6,2 * | 156 ± 5,4 ** | 106,2 ± 5 |
| Esterase (mU/mg Protein) | 115,1 ± 1,4 | 92,6 ± 11,9 | 92,1 ± 37,5 | 200,7 ± 6,1 *** |
| Katalase (BU/mL) | n.g. | 183,3 ± 1,1 ** | 272,9 ± 0,7 *** | 1041,6 ± 0,6 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 89,4 ± 5 | 90,5 ± 8,2 | 116,7 ± 6,5 | 250,7 ± 5,8 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 84,6 ± 16,1 | 173,3 ± 28 | 270,9 ± 8 ** | 1001,6 ± 10,2 *** |

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

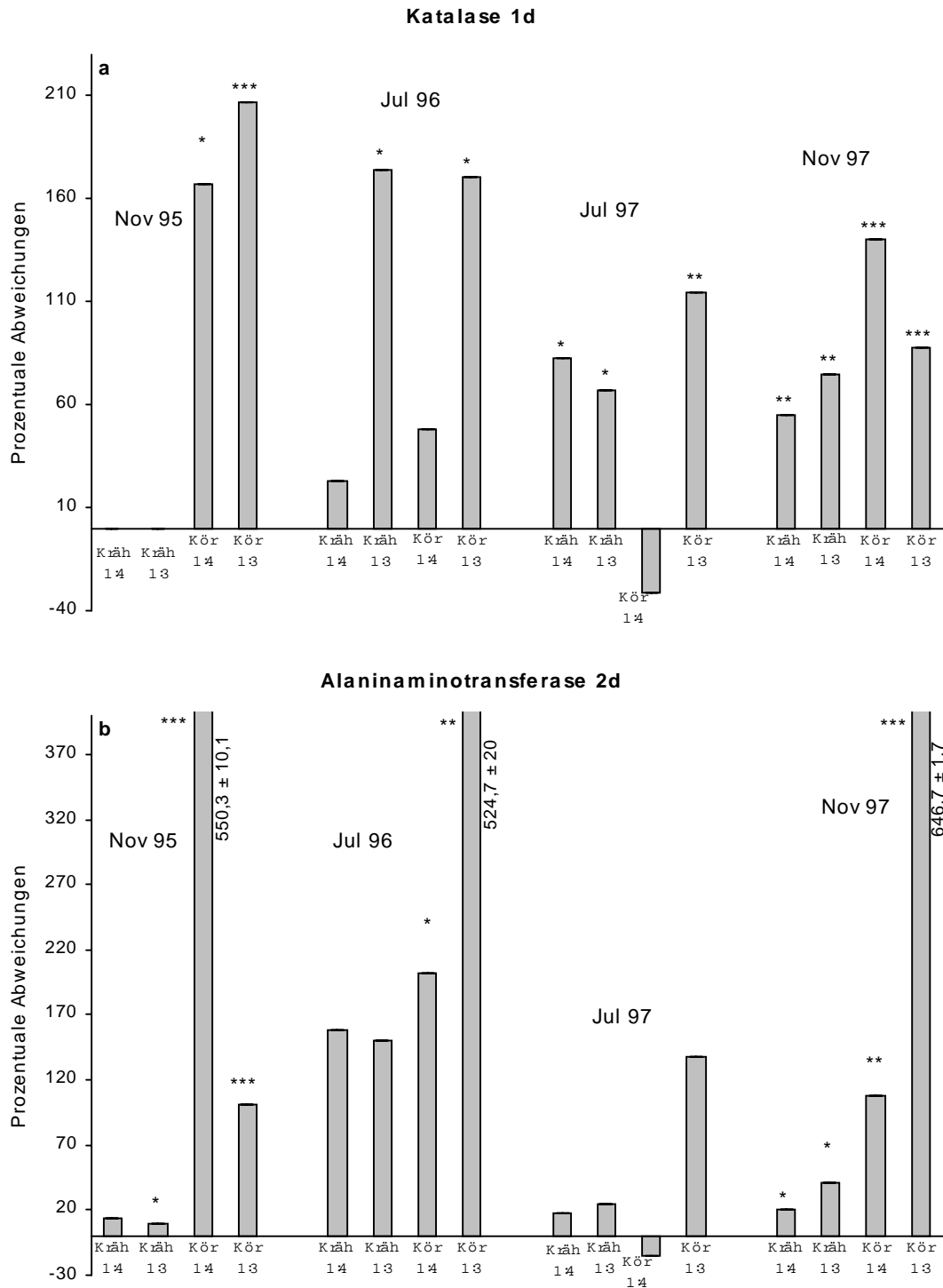


Abb. 4.1: Relative Enzymaktivitäten der Katalase (a) und Alaninaminotransferase (b) in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit nativem Krähenbach- und Körschwasser.

Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

zu verschiedenen Probennahme-Zeitpunkten unter den Kontrollwert ab (Tab. 4.1, 4.2). Die Aktivität der Alaninaminotransferase zeigte nach 1 und 2 d Belastung mit Krähenbach- und v.a. Körschwasser meist einen deutlichen Anstieg (Tab. 4.1, 4.2; Abb. 4.1).

Endoplasmatisches Retikulum. Mit Krähenbachwasser belastete isolierte Hepatocyten zeigten nach 1 und 2 d oft einen deutlichen Aktivitätsrückgang der unspezifischen Esterase (Tab. 4.1, 4.2). Im Vergleich dazu konnte man bei der Körsch meist einen klaren Anstieg der Esterase feststellen (Tab. 4.1, 4.2).

Biotransformation. Die Aktivität des Biotransformationsenzym der Phase II Glutathion S-Transferase zeigte nur nach 1 d Belastung mit Krähenbach- und Körschwasser der Juli 1996 und November 1997 Probennahmen eine einheitliche Zunahme (Tab. 4.1, 4.2).

Peroxisomen. Die Katalase wies nach 1 und 2 d Belastung mit nativem Wasser beider Bäche meist eine starke Aktivitätszunahme auf (Tab. 4.1, 4.2; Abb. 4.1).

Lysosomen. In isolierten Hepatocyten war nach 2 d Belastung mit Körschwasser ein auffälliger Aktivitätsanstieg der lysosomalen Sauren Phosphatase zu beobachten (Tab. 4.1, 4.2). Dagegen konnte man beim Krähenbach oft einen Aktivitätsrückgang der Sauren Phosphatase unter den Kontrollwert messen (Tab. 4.1, 4.2).

Lipidperoxidation. Die Lipidperoxidationsrate lag bei der Körsch meist signifikant über dem Kontrollwert (Tab. 4.1, 4.2). Beim Krähenbach führte die 1 d Belastung der Hepatocyten mit nativem Wasser zum Anstieg der Lipidperoxidationsrate zu allen Probennahmen-Zeitpunkten mit Ausnahme von November 1995 (Tab. 4.1, 4.2)

Die Aktivitäten aller erfaßten Enzyme sowie die Lipidperoxidationsrate in den isolierten Hepatocyten zeigten bei Wasser aus Krähenbach und Körsch in beiden Konzentrationen Abweichungen zur Kontrolle. Während bei der Körsch mit Ausnahme der Glutathion S-Transferase die gemessenen Enzymaktivitäten und die Lipidperoxidationsrate meist deutlich anstiegen, zeigte der Krähenbach oft einen Aktivitätsrückgang der Esterase und Sauren Phosphatase.

4.2.2 Biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Porenwasser auf isolierte Hepatocyten (Tab. 4.3, 4.4)

Cytoplasma. Die Aktivität der cytosolischen und freigesetzten Laktatdehydrogenase in isolierten Hepatocyten zeigte nach 1 und 2 d Belastung mit Krähenbach- und Körsch-Porenwasser vor allem für die Körsch einen auffälligen Anstieg (Tab. 4.3, 4.4). Besonders die Körsch 1:3 Porenwasserverdünnung zeigte eine signifikante Aktivitätszunahme der freigesetzten Laktatdehydrogenase (Tab. 4.3, 4.4; Abb. 4.2).

Nach Belastung mit Körsch Porenwasser wiesen belastete Hepatocyten vor allem nach 2 d einen klaren Aktivitätsanstieg der Alaninaminotransferase auf (Tab. 4.3, 4.4). Dagegen konnte man beim Krähenbach sowohl einen Aktivitätsanstieg als auch einen Aktivitätsrückgang der Alaninaminotransferase unter den Kontrollwert beobachten (Tab. 4.3, 4.4).

Endoplasmatisches Retikulum. Die unspezifische Esterase zeigte nach Belastung mit Körsch-Porenwasser überwiegend eine Zunahme der Aktivität (Tab. 4.3, 4.4), während beim Krähenbach die Aktivität der Esterase oft zurückging (Tab. 4.3, 4.4).

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

Tab. 4.3: Relative Enzymaktivitäten in isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) nach Belastung mit Porenwasser aus Krähenbach- und Körschsediment (Probennahmen Juli 1996 und 1997).

| 1 Tag (Probennahme Juli 1996) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
|---|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 139,4 ± 1 *** | 149,3 ± 0,6 *** | 68,6 ± 3,5 *** | 155,7 ± 1,4 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 144,6 ± 3,3 *** | 153,6 ± 5,6 *** | 207,9 ± 12,4 * | 559,4 ± 3,7 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 108,7 ± 10,7 | 132,9 ± 16,6 | 121,6 ± 19,8 | 136 ± 4,3 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 123,6 ± 1,2 *** | 137 ± 2,4 *** | 91,8 ± 4,5 *** | 89 ± 6,4 |
| Esterase (mU/mg Protein) | 96,1 ± 8,6 | 115,8 ± 3,2 ** | 100,9 ± 10,2 | 105,5 ± 9,2 |
| Katalase (BU/mL) | 125 ± 16 | 225 ± 2,2 *** | 75 ± 33,3 | 100 ± 25 |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 75,5 ± 2,1 *** | 91,2 ± 5,7 *** | 126,2 ± 4,4 ** | 157,8 ± 20,6 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 142,1 ± 21,3 | 161,7 ± 13,9 * | 158,8 ± 19,7 * | 243,1 ± 12,5 * |
| 2 Tag (Probennahme Juli 1996) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 130,9 ± 3,4 * | 147,2 ± 1,3 *** | 69,5 ± 11,6 *** | 87,2 ± 2,7 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 545,2 ± 2,1 *** | 657,9 ± 6,6 *** | 569,1 ± 5,5 *** | 836 ± 4,5 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 89,7 ± 17,2 | 112,3 ± 17,3 | 220,1 ± 21,6 ** | 291,4 ± 15,7 * |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 68,8 ± 5,3 *** | 58,5 ± 5,5 *** | 32,3 ± 12,3 *** | 27,7 ± 12 |
| Esterase (mU/mg Protein) | 67,5 ± 17,7 | 57,6 ± 29,3 | 96,5 ± 8,5 | 103,2 ± 10,8 |
| Katalase (BU/mL) | 125 ± 18 | 300 ± 0,8 *** | 200 ± 25 ** | 350 ± 21,4 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 97,2 ± 1,4 *** | 108 ± 12,1 * | 198,1 ± 5,7 | 196,1 ± 1,5 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 113,5 ± 11,1 * | 172 ± 32,9 | 411,7 ± 8,9 *** | 430,6 ± 9,8 *** |
| 1 Tag (Probennahme Juli 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 108,2 ± 2,7 | 110,2 ± 0,6 | 153,4 ± 13,4 ** | 201,8 ± 3,0 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 105,4 ± 7,7 | 111,2 ± 4,1 | 250,1 ± 13,3 * | 311,7 ± 7,2 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 60,5 ± 16,6 * | 115,3 ± 13,3 | 79,4 ± 2,4 *** | 101,1 ± 0,6 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 111,1 ± 1,4 * | 101,3 ± 1,7 | 143,1 ± 3,8 *** | 192,6 ± 3,4 *** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 97,9 ± 8,6 | 113,6 ± 4,5 | 137,5 ± 3,9 *** | 173,4 ± 13,5 * |
| Katalase (BU/mL) | 74,5 ± 2,6 * | 139,2 ± 2,8 *** | 98,0 ± 4,0 | 123,5 ± 1,5 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 102,7 ± 8,3 | 152,4 ± 3,9 *** | 92,7 ± 10,1 | 74,3 ± 3,8 ** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 65,9 ± 14,7 * | 106,0 ± 14,1 | 39,4 ± 12,0 *** | 55,9 ± 15,5 * |
| 2 Tag (Probennahme Juli 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 141,2 ± 4,8 ** | 147,8 ± 2,2 *** | 176,8 ± 3,6 *** | 124,3 ± 3,3 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 146,6 ± 23,4 | 194,6 ± 9,5 ** | 132,7 ± 8,1 * | 385,8 ± 6,1 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 55,4 ± 12,8 * | 167,1 ± 21,6 | 159,9 ± 17,3 * | 225,5 ± 13,3 * |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 124,6 ± 1,4 ** | 123,6 ± 1,8 ** | 108,1 ± 3,5 | 140,9 ± 5,5 *** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 121,7 ± 14,5 | 128,4 ± 14,2 | 188,5 ± 3,7 *** | 104,5 ± 17,6 |
| Katalase (BU/mL) | 104,4 ± 6,3 | 277,7 ± 3,2 *** | 291,1 ± 0,7 *** | 346,6 ± 1,2 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 126,9 ± 3,3 ** | 104,8 ± 4,3 | 81,8 ± 7,4 * | 43,4 ± 4,3 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 107,4 ± 15,1 | 177,7 ± 13,2 * | 173,7 ± 19,2 | 199,9 ± 24,2 |

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

Tab. 4.4: Relative Enzymaktivitäten in isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) nach Belastung mit Porenwasser aus Krähenbach- und Körschsediment (Probennahmen November 1997 und Juli 1998).

| 1 Tag (Probennahme November 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
|---|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 104 ± 7,9 | 101,1 ± 2,3 | 111,7 ± 1 | 108,7 ± 0,9 |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 388,7 ± 4,7 *** | 178,9 ± 10 | 308,9 ± 4,2 *** | 295,9 ± 24,5 |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 207,2 ± 13,3 * | 147,5 ± 1,6 ** | 99 ± 0,1 | 104,1 ± 33,3 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 107,1 ± 3,2 | 91,8 ± 3,6 | 106,1 ± 4 | 81,1 ± 1,6 * |
| Esterase (mU/mg Protein) | 113,3 ± 5,4 | 105,8 ± 1,3 | 87,4 ± 0,1 * | 125,2 ± 6,1 |
| Katalase (BU/mL) | 250 ± 1 *** | 205,0 ± 1,2 *** | 140 ± 0,1 *** | 187,5 ± 0,1 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 135,6 ± 7,4 * | 156,3 ± 6,1 * | 151,2 ± 1,8 ** | 150,6 ± 2,3 ** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 258,3 ± 14,1 *** | 164,3 ± 13,4 | 117,3 ± 9,8 | 156,7 ± 5,5 ** |
| 2 Tag (Probennahme November 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 130,2 ± 3,8 * | 110,1 ± 3,3 | 143,2 ± 0,8 ** | 181,4 ± 3,8 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 106,5 ± 24,7 | 76,6 ± 5,4 * | 164 ± 18,2 | 236,6 ± 3,9 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 201,3 ± 13,3 * | 167,4 ± 10,8 | 158,3 ± 0,1 ** | 130,6 ± 0,1 * |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 120,7 ± 8 | 100,4 ± 10,6 | 117,9 ± 0,1 ** | 83,9 ± 10,8 |
| Esterase (mU/mg Protein) | 97,3 ± 4,2 | 110,3 ± 8,3 | 120 ± 1,3 * | 93,9 ± 7,8 |
| Katalase (BU/mL) | 200 ± 1 *** | 139,5 ± 0,1 *** | 229,1 ± 0,1 *** | 202,1 ± 3,1 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 118,8 ± 6,3 | 112,8 ± 5,9 | 410,9 ± 15,7 *** | 583,7 ± 10,5 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 260,4 ± 13,9 ** | 134,6 ± 9,5 | 182,2 ± 10,1 ** | 193,7 ± 9,9 ** |
| 1 Tag (Probennahme Juli 1998) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 125,6 ± 0,7 *** | 114,1 ± 2 ** | 156,8 ± 0,6 *** | 327,9 ± 5,3 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 277,7 ± 3,7 *** | 219,2 ± 4,7 *** | 257,6 ± 2,4 *** | 403 ± 4 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 39,1 ± 35,2 *** | 356 ± 37,4 ** | 178,5 ± 31,3 ** | 30,8 ± 113,8 ** |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 131,3 ± 1,9 ** | 131,8 ± 2,9 *** | 180,5 ± 5,2 *** | 326,7 ± 3,7 *** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 111,5 ± 2,5 | 112,3 ± 2,2 ** | 155,5 ± 12 | 305 ± 2,5 *** |
| Katalase (BU/mL) | 85,7 ± 5 | 85,7 ± 5 | 85,7 ± 33,3 | 157,1 ± 36,3 |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 79,7 ± 6,5 *** | 89,2 ± 9 ** | 84,3 ± 1,4 | 97,9 ± 53,3 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 132 ± 9,4 ** | 134,9 ± 13,2 | 111,7 ± 4,1 *** | 93,2 ± 7,8 |
| 2 Tag (Probennahme Juli 1998) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 183,1 ± 2,1 *** | 329,6 ± 1,1 *** | 236 ± 4,3 *** | 227,9 ± 0,7 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 369,5 ± 8,7 ** | 512,1 ± 14,1 *** | 444,9 ± 4,1 *** | 309,3 ± 7,7 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 112,2 ± 35,2 | 79,5 ± 57,7 | 144,9 ± 55,1 | 365,8 ± 29,6 ** |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 126,7 ± 1,9 *** | 180,6 ± 5,8 *** | 190,9 ± 2,5 ** | 140,4 ± 5,2 *** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 132 ± 10,1 | 183,9 ± 4,2 ** | 169,4 ± 3,5 ** | 157,8 ± 2,1 *** |
| Katalase (BU/mL) | 275 ± 36,3 | 175 ± 2,8 ** | 100 ± 7,5 | 125 ± 10 * |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 145 ± 9,2 ** | 90,7 ± 2,4 *** | 101,6 ± 8,5 | 52,5 ± 13 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 118,3 ± 11 | 96,1 ± 10,3 | 86,1 ± 13,5 | 94,4 ± 11,2 |

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

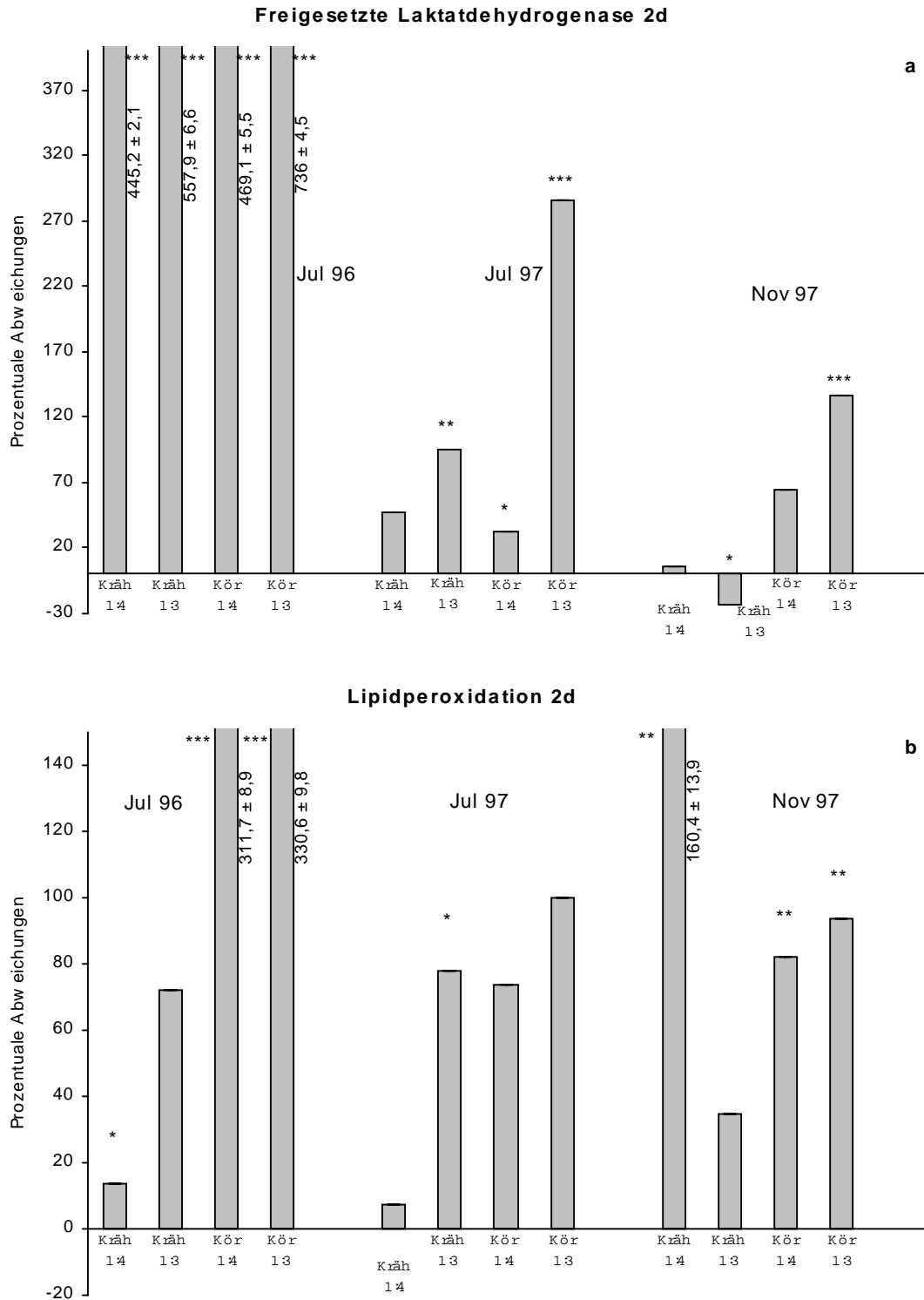


Abb. 4.2: Relative Enzymaktivitäten der Freigesetzten Laktatdehydrogenase (a) und die Lipidperoxidationsrate (b) in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit Krähenbach- und Körschporenwasser.

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

Biotransformation. Beim Biotransformationsenzym Glutathion S-Transferase war nur nach 1 und 2 d Belastung mit Porenwasser der Juli 1997 und 1998 Probennahmen beim Krähenbach und der Körsch eine einheitliche Aktivitätszunahme zu beobachten (Tab. 4.3, 4.4).

Peroxisomen. Zu allen Probennahmen zeigten die mit Krähenbach- und Körsch-Porenwasser für 2 d belasteten Hepatocyten eine meist signifikante Zunahme der Katalaseaktivität (Tab. 4.3, 4.4).

Lysosomen. Die mit Krähenbach- und Körsch-Porenwasser belasteten Hepatocyten wiesen über die drei Probennahmen hinweg kein einheitliches Aktivitätsbild der lysosomalen Sauren Phosphatase auf (Tab. 4.3, 4.4).

Lipidperoxidation. Die Lipidperoxidationsrate lag beim Krähenbach und der Körsch meist deutlich über der Kontrolle (Tab. 4.3, 4.4; Abb. 4.2).

Eine Belastung der Primärhepatocyten mit Krähenbach- und Körsch-Porenwasser bewirkte einen Aktivitätsanstieg der cytosolischen und freigesetzten Laktatdehydrogenase, der Katalase sowie eine auffällige Zunahme der Lipidperoxidationsrate. Dagegen zeigte die Esterase oft eine Aktivitätsabnahme beim Krähenbach. Wiederum waren die Aktivitätsabweichungen zur Kontrolle bei der Körsch stärker im Vergleich zum Krähenbach.

4.2.3 Biochemische Untersuchungen zur Wirkung von wässrigen Sedimenteluat auf isolierte Hepatocyten (Tab. 4.5)

Cytoplasma. Während die cytosolische Laktatdehydrogenase bei Krähenbach und Körsch zu den verschiedenen Probennahmen kein einheitliches Aktivitätsbild zeigte, stieg die Aktivität der freigesetzten Laktatdehydrogenase nach 2 d Belastung bei beiden Bächen deutlich an (Tab. 4.5; Abb. 4.3). Eine Belastung der Zellen mit Körsch Eluat induzierte meist einen deutlichen Aktivitätsanstieg der Alaninaminotransferase (Tab. 4.5). Dagegen zeigte die Alaninaminotransferase beim Krähenbach tendenziell einen Aktivitätsrückgang (Tab. 4.5).

Endoplasmatisches Retikulum. Die Aktivität der unspezifischen Esterase sank nur bei Körsch Sedi-
menteluat (Verdünnung 1:3) nach 1 und 2 d Belastung an beiden Probeterminen meist deutlich unter die Kontrolle (Tab. 4.5; Abb. 4.3). Die mit Krähenbach-Sedimenteluat belasteten isolierten Hepatocyten zeigten dagegen nur bei der Juli 1996 Probennahme einen Aktivitätsrückgang der unspezifischen Esterase (Tab. 4.5; Abb. 4.3).

Biotransformation. Während die Glutathion S-Transferase zum Probetermin Juli 1996 bei beiden Bächen nach 1 d Belastung einen signifikanten Aktivitätsanstieg ergab, lag ihre Aktivität zum Probetermin Juli 1997 deutlich unter der Kontrolle (Tab. 4.5).

Peroxisomen. Die Aktivität der peroxisomalen Katalase nahm bei beiden Bächen zur Probennahme Juli 1997 zu (Tab. 4.5). Die Körsch zeigte dabei an beiden Expositionstagen im Vergleich zum Krähenbach eine weit höhere Katalaseaktivität (Tab. 4.5).

Lysosomen. Vergleicht man die Aktivität der lysosomalen Sauren Phosphatase über die verschiedenen Probennahmen hinweg, so läßt sich für beide Fließgewässer kein einheitliches Aktivitätsbild erkennen (Tab. 4.5). Nur zur Probennahme November 1995 stieg die Aktivität der Sauren Phosphatase nach 2 d Belastung in beiden Bächen einheitlich an (Tab. 4.5).

Lipidperoxidation. Die Lipidperoxidationsrate lag sowohl Krähenbach als auch Körsch zum Probetermin Juli 1996 und Juli 1997 teilweise signifikant über dem Kontrollwert (Tab. 4.5). Im November

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

Tab. 4.5: Relative Enzymaktivitäten in isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) nach Belastung mit wässrigem Eluat aus Krähenbach- und Körschsediment (Probennahmen November 1995, Juli 1996 und 1997).

| 1 Tag (Probennahme November 1995) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
|---|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 96,9 ± 2,8 | 106,5 ± 2,8 ** | 126,6 ± 3,1 | 140,9 ± 1,9 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/ml) | 110,6 ± 6,8 | 134,5 ± 0,5 *** | 95,5 ± 2,7 | 134,9 ± 5,9 * |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 107,7 ± 2,9 | 107,4 ± 2,6 | 90,5 ± 3,4 ** | 87,6 ± 4 ** |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 95,1 ± 6,5 | 105 ± 11 | 116,9 ± 20 | 99,6 ± 12,3 |
| Esterase (mU/mg Protein) | 134 ± 6,4 *** | 94,7 ± 6,2 * | 65,2 ± 12,4 *** | 58,5 ± 38,6 |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 87,1 ± 19,9 | 143,6 ± 7,9 | 52,5 ± 10,3 ** | 80,1 ± 8 ** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 54,9 ± 32 | 62,6 ± 16,7 | 81,3 ± 1,8 | 60,8 ± 15,2 |
| 2 Tag (Probennahme November 1995) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 90,8 ± 10 | 87,9 ± 3,5 | 81,9 ± 7,3 ** | 92,7 ± 2,9 |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/ml) | 142,9 ± 5,6 ** | 131,9 ± 2,8 | 143,8 ± 4,6 | 151,4 ± 3,3 |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 96,8 ± 5,3 | 121,1 ± 5,8 * | 127,6 ± 2,8 ** | 116,8 ± 3,2 * |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 100,8 ± 9,1 | 87,6 ± 32,6 | 120,3 ± 36,4 | 85,5 ± 19,8 |
| Esterase (mU/mg Protein) | 199,1 ± 4,2 *** | 135,2 ± 10,8 * | 154,4 ± 4,8 *** | 87,4 ± 9,1 |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 131,5 ± 24,9 | 145,3 ± 24,3 | 145,9 ± 30,7 | 136,9 ± 32,6 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 84 ± 11,5 | 82,3 ± 0,6 | 76,3 ± 25,7 | 100,4 ± 9,4 |
| 1 Tag (Probennahme Juli 1996) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 99,5 ± 3,2 | 120,5 ± 0,7 *** | 141,4 ± 0,5 *** | 153,5 ± 0,5 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/ml) | 105,8 ± 6,9 | 126,6 ± 2,8 ** | 95,7 ± 1,6 | 140,6 ± 12 * |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 111,2 ± 10,1 | 132,9 ± 7,8 | 123,3 ± 8,7 * | 158,8 ± 2,9 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 86,9 ± 15,5 | 137,6 ± 5,9 ** | 110,1 ± 2,6 ** | 143,5 ± 3,3 *** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 96,5 ± 7,8 | 103,2 ± 7,8 | 91,6 ± 7,8 | 87,5 ± 9 * |
| Katalase (BU/mL) | 100 ± 25 | 125 ± 20 *** | 75 ± 33,3 | 125 ± 20 * |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 75,8 ± 1,1 *** | 100,8 ± 4,5 | 89,7 ± 5,6 | 105,3 ± 3,1 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 130,3 ± 18,7 | 122,5 ± 6,4 * | 103,9 ± 22,6 | 142,1 ± 13,1 * |

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

| 2 Tag (Probennahme Juli 1996) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 85,5 ± 3,5 | 87,1 ± 6,5 | 138,9 ± 0,5 *** | 158 ± 0,5 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/ml) | 121,4 ± 5,9 ** | 162 ± 1,6 *** | 135,4 ± 12,9 * | 183 ± 10,4 ** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 112 ± 13,1 | 121,7 ± 9 | 111,4 ± 10,4 | 130,2 ± 6,5 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 91,8 ± 4,3 | 81,3 ± 1,3 * | 108,3 ± 1,9 *** | 112,3 ± 2,3 * |
| Esterase (mU/mg Protein) | 89,2 ± 6,6 | 80 ± 4 | 120,4 ± 3 ** | 98,5 ± 4,4 ** |
| Katalase (BU/mL) | ng | 175 ± 28,5 *** | ng | ng |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 75,7 ± 5,8 * | 90,3 ± 2 *** | 91,5 ± 2,8 | 102,2 ± 3,7 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 102,7 ± 7,8 | 134,2 ± 7,3 * | 83,7 ± 6,4 | 118,9 ± 5,3 |
| 1 Tag (Probennahme Juli 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 81,9 ± 1,9 *** | 73,7 ± 2,1 *** | 105,3 ± 2,3 * | 175,8 ± 2,7 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/ml) | 60,9 ± 8,4 | 40,5 ± 10,8 * | 261,3 ± 5,4 *** | 289,0 ± 0,1 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 81,6 ± 10,8 | 90,8 ± 1,3 * | 151,3 ± 17,3 | 254,2 ± 1,3 *** |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 92,8 ± 10,4 | 93,5 ± 3,3 | 83,8 ± 6,6 * | 87,9 ± 4,1 * |
| Katalase (BU/mL) | 109,2 ± 1,9 | 127,6 ± 1,0 ** | 328,9 ± 0,4 *** | 901,3 ± 1,1 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 99,3 ± 11,3 | 105,3 ± 8,3 | 101,2 ± 15,1 | 98,4 ± 3,3 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 141,4 ± 10,5 * | 112,4 ± 33,7 | 526,5 ± 8,9 *** | 598,9 ± 18,4 ** |
| 2 Tag (Probennahme Juli 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:3 | Körsch 1:4 | Körsch 1:3 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 159,8 ± 4,8 *** | 118,1 ± 7,0 *** | 93,1 ± 2,0 *** | 279,1 ± 4,5 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/ml) | 459,1 ± 17,7 ** | 400,0 ± 7,1 *** | 212,4 ± 2,7 *** | 781,7 ± 9,6 *** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 84,5 ± 12,3 | 63,4 ± 12,3 | 333,3 ± 21,6 | 174,7 ± 26,6 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 139,2 ± 11,1 ** | 68,1 ± 2,0 * | 34,8 ± 15,7 *** | 27,6 ± 8,6 *** |
| Katalase (BU/mL) | 147,1 ± 0,1 *** | 107,1 ± 0,1 | 970,0 ± 0,5 *** | 331,4 ± 0,1 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 104,1 ± 4,8 | 80,2 ± 19,3 | 52,9 ± 14,2 *** | 93,7 ± 24,5 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 214,2 ± 7,4 ** | 141,0 ± 13,6 * | 501,2 ± 12,7 ** | 1660,2 ± 17,8 *** |

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

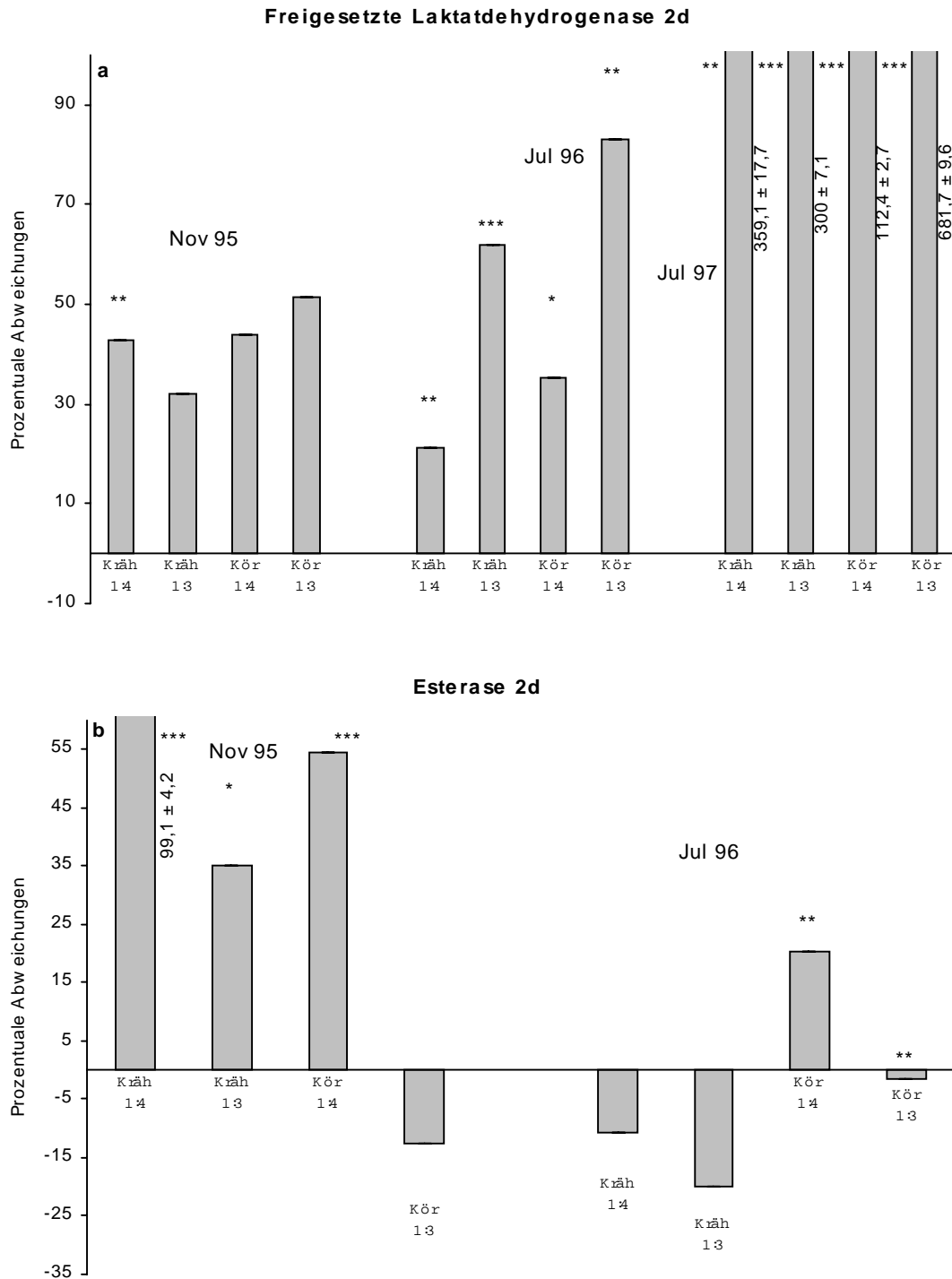


Abb. 4.3: Relative Enzymaktivitäten der Freigesetzten Laktatdehydrogenase (a) und Esterase (b) in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit wässrigem Eluat aus Krähenbach- und Körschsediment.

Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

1995 konnte man bei den mit Krähenbach und Körsch Sedimenteluat belasteten Hepatocyten einen Rückgang der Lipidperoxidationsrate unter den Kontrollwert beobachten (Tab. 4.5).

Das Sedimenteluat beider Bäche induzierte also sowohl einen Aktivitätsanstieg der freigesetzten Laktatdehydrogenase als auch der Katalase. Beim Körsch-Eluat konnte des weiteren eine Aktivitätszunahme der Alaninaminotransferase bei den verschiedenen Probennahmen beobachtet werden.

4.2.4 Biochemische Untersuchungen zur Wirkung von acetonischen Sedimentextrakt auf isolierte Hepatocyten (Tab. 4.6)

Cytoplasma. Eine 1 d Belastung der isolierten Hepatocyten mit acetonischen Sedimentextrakt beider Bäche führte bei den Probennahmen Juli 1996 und 1997 zu einem starken Anstieg der cytosolischen und freigesetzten Laktatdehydrogenaseaktivität (Tab. 4.6; Abb. 4.4). Einen ähnlichen Aktivitätsanstieg konnte man auch mit Ausnahme der Juli 1998 Probennahme bei der Alaninaminotransferase beobachten (Tab. 4.6).

Endoplasmatisches Retikulum. Die Aktivität der unspezifischen Esterase zeigte nach 1 d Belastung der Hepatocyten mit acetonischen Sedimentextrakt der Körsch einen deutlichen Rückgang (Tab. 4.6). Nach 2 d Belastung lag in beiden Bächen die Esteraseaktivität dagegen meist über der Kontrolle (Tab. 4.6).

Biotransformation. Die Aktivität der Glutathion S-Transferase nahm nach 1 und 2 d Belastung mit Körsch-Sedimentextrakt zu den Juli 1996 und 1998 Probenahmeterminen deutlich ab, während beim Krähenbach die Reaktionen wenig einheitlich waren (Tab. 4.6).

Peroxisomen. Die Aktivität der Katalase nahm nach 1 und 2 d Exposition mit acetonischen Sedimentextrakt bei beiden Fließgewässern meist signifikant zu (Tab. 4.6).

Lysosomen. Ebenfalls konnte man auch bei der Sauren Phosphatase nach 2 d Belastung überwiegend einen Aktivitätsanstieg beim Krähenbach und der Körsch feststellen (Tab. 4.6).

Lipidperoxidation. Die Lipidperoxidation sank nach 2 d Belastung zu den Probennahmen Juli 1996 und 1998 bei beiden Bächen unter den Kontrollwert (Tab. 4.6).

Während die Aktivität der cytosolischen und freigesetzten Laktatdehydrogenase, Katalase und Sauren Phosphatase beim Krähenbach und der Körsch meist zunahm, sank die Lipidperoxidationsrate bei beiden Fließgewässern unter den Kontrollwert. Bei der Körsch konnten im Vergleich zum Krähenbach stärkere Abweichungen von der Kontrolle beobachtet werden.

4.2.5 Diskussion

Eine Belastung der isolierten Hepatocyten mit nativem Wasser, Porenwasser, wäßrigem Sedimenteluat und acetonischem Sedimentextrakt von Krähenbach und Körsch induzierte bei allen Probennahmen bereits nach 1 d Abweichungen von den Kontrollzellen. Jedoch ergaben die Befunde im Vergleich zwischen den einzelnen Probennahmen nicht immer ein einheitliches Bild. Die untersuchten Enzyme bzw. die Lipidperoxidationsrate zeigten Schwankungen zwischen den Probennahmen und den Probeverdünnungen. Die Ursachen könnten z.T. in den starken saisonalen Schwankungen des Vorkommens der verschiedenen Chemikalien in den beiden Bächen liegen. Während einige Pestizide zeitweise in der Körsch nicht nachweisbar waren, konnten PAHs über die gesamte Probennahmedauer

nachge

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

Tab. 4.6: Relative Enzymaktivitäten in isolierten Hepatocytten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) nach Belastung mit acetonischem Extrakt aus Krähenbach- und Körschsediment (Probennahmen Juli 1996, 1997 und 1998).

| 1 Tag (Probennahme Juli 1996) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:2 | Körsch 1:4 | Körsch 1:2 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 126,1 ± 17,3 | 164,4 ± 25,3 | 261,7 ± 12,9 * | 467,7 ± 5,3 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 127,9 ± 1,2 ** | 135,6 ± 30,2 | 119,1 ± 4,1 ** | 128,5 ± 3,6 * |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 103,4 ± 2,8 | 138,4 ± 13,7 | 118,7 ± 5,3 | 140,5 ± 9 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 89 ± 4 | 104,4 ± 3 ** | 88 ± 6,9 | 96,9 ± 4,6 * |
| Esterase (mU/mg Protein) | 150 ± 3,3 * | 150 ± 3,3 * | 100 ± 5 | 200 ± 2,5 * |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 109 ± 0,8 * | 140 ± 2 * | 116,3 ± 0,5 *** | 138,3 ± 1,2 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 91,4 ± 15,6 | 105,7 ± 13,5 | 71,4 ± 20 | 102,8 ± 11,1 |
| 2 Tag (Probennahme Juli 1996) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:2 | Körsch 1:4 | Körsch 1:2 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 135,9 ± 30,5 | 338,2 ± 3,6 *** | 669 ± 3,9 * | 977,8 ± 1,1 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 107,9 ± 3,2 *** | 129,3 ± 3,8 *** | 87,2 ± 9,3 | 115,6 ± 16,1 * |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 102,9 ± 1,9 ** | 117,6 ± 5,5 * | 124,4 ± 14,7 | 162,7 ± 17,5 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 89,3 ± 3,1 | 82 ± 3,9 ** | 80,6 ± 13,4 | 82,2 ± 5,4 |
| Esterase (mU/mg Protein) | 100 ± 3,3 | 133,3 ± 2,5 * | 133,3 ± 2,5 * | 233,3 ± 1,4 ** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 107,7 ± 0,8 | 132,1 ± 1,6 ** | 115,6 ± 1,7 | 126,9 ± 1,8 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 83,7 ± 16,1 | 83,7 ± 19,3 | 59,4 ± 27,2 | 89,1 ± 30,3 |
| 1 Tag (Probennahme Juli 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:2 | Körsch 1:4 | Körsch 1:2 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 113,4 ± 1,9 | 134,8 ± 1,2 *** | 124,2 ± 5,4 * | 116,7 ± 1,0 ** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 134,5 ± 4,8 ** | 127,6 ± 8,5 | 125,8 ± 2,9 ** | 130,7 ± 8,5 * |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 119,3 ± 12,3 | 148,4 ± 13,3 | 95,2 ± 4,3 | 119,8 ± 2,6 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 90,9 ± 6,0 ** | 116,1 ± 1,7 *** | 99,4 ± 6,6 | n.g. |
| Esterase (mU/mg Protein) | 104,4 ± 5,5 * | 114,1 ± 10,1 ** | 89,8 ± 23,5 | 68,2 ± 11,1 *** |
| Katalase (BU/mL) | 121,4 ± 3,9 * | 159,5 ± 15,0 | 114,2 ± 6,2 * | 116,6 ± 4,1 *** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 79,9 ± 1,9 * | 99,4 ± 18,5 | 68,7 ± 19,2 * | 48,8 ± 2,7 ** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 53,5 ± 11,0 ** | 80,3 ± 7,8 ** | 112,6 ± 16,9 | 103,8 ± 22,5 |

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

| 2 Tag (Probennahme Juli 1997) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:2 | Körsch 1:4 | Körsch 1:2 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 118,5 ± 1,8 * | 137,2 ± 1,9 ** | 166,8 ± 1,8 *** | 126,8 ± 0,4 *** |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 108,3 ± 3,7 | 125,8 ± 5,3 | 102,7 ± 5,1 | 146,1 ± 1,3 ** |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 115,3 ± 4,5 | 108,7 ± 12,3 | 118,1 ± 26,6 | 84,1 ± 15,7 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 132,6 ± 1,1 *** | 120,8 ± 1,7 *** | 144,1 ± 6,8 * | n.g. |
| Esterase (mU/mg Protein) | 114,8 ± 17,5 | 124,9 ± 5,8 | 118,2 ± 1,7 | 88,5 ± 21,6 |
| Katalase (BU/mL) | 127,2 ± 6,3 * | 127,2 ± 2,3 ** | 148,4 ± 4,1 ** | 127,2 ± 2,3 ** |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 119,2 ± 4,5 | 125,1 ± 28,7 | 98,8 ± 7,7 | 176,1 ± 8,8 ** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 75,0 ± 27,7 | 90,5 ± 37,4 | 135,4 ± 23,4 | 152,1 ± 19,2 |
| 1 Tag (Probennahme Juli 1998) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:2 | Körsch 1:4 | Körsch 1:2 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 223,2 ± 0,6 *** | 83,4 ± 2,6 | 107,5 ± 4,7 ** | 92,9 ± 12,6 |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 108,1 ± 13,6 | 88,8 ± 3,0 | 97,1 ± 3,2 *** | 80,5 ± 4,9 |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 90,1 ± 4,1 | 95,1 ± 5,1 *** | 97,6 ± 3,5 | 84,4 ± 2,8 *** |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 71,1 ± 4,8 *** | 57,1 ± 5,8 *** | 76,9 ± 2,9 *** | 68,5 ± 10,6 ** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 79,0 ± 14,9 | 79,7 ± 4,0 * | 81,3 ± 4,0 | 77,7 ± 8,7 |
| Katalase (BU/mL) | 150 ± 3,3 * | 100 ± 10 | 100 ± 5 | 150 ± 10 |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 94,1 ± 2,4 *** | 110,2 ± 4,5 * | 118,9 ± 3,8 *** | 103,8 ± 20,5 |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 106,5 ± 16,6 | 90,4 ± 16,4 | 85,6 ± 19,8 | 86,8 ± 16,6 |
| 2 Tag (Probennahme Juli 1998) | Krähenbach 1:4 | Krähenbach 1:2 | Körsch 1:4 | Körsch 1:2 |
| Laktat-Dehydrogenase (mU/mg Protein) | 85,4 ± 2,5 ** | 49,2 ± 5,9 *** | 97,1 ± 12,9 | 94,6 ± 7,1 |
| Freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (mU/mL) | 97,8 ± 6,5 | 87,6 ± 6,3 | 122,7 ± 1,6 | 95,3 ± 4,5 |
| Alanin-Amino-Transferase (mU/mg Protein) | 105,4 ± 5,5 | 102,5 ± 2,1 | 104,6 ± 2,0 | 98,2 ± 9,7 |
| Glutathion S-Transferase (mU/mg Protein) | 104,6 ± 2,0 ** | 86,9 ± 10,1 | 93,2 ± 0,9 | 82,4 ± 3,2 ** |
| Esterase (mU/mg Protein) | 111,6 ± 1,8 | 114,9 ± 2,7 | 114,4 ± 1,7 | 102,9 ± 5,1 |
| Katalase (BU/mL) | 66, ± 10 | 100 ± 3,3 | 100 ± 6,6 | 133,3 ± 5 |
| Saure Phosphatase (mU/mg Protein) | 104,2 ± 9,8 | 103,2 ± 0,2 | 97,1 ± 1,2 *** | 109,8 ± 1,9 *** |
| Lipidperoxidation (µmol/mg Protein) | 90,1 ± 16,7 | 93,3 ± 22,1 | 93,9 ± 11,9 | 85,6 ± 19,8 |

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

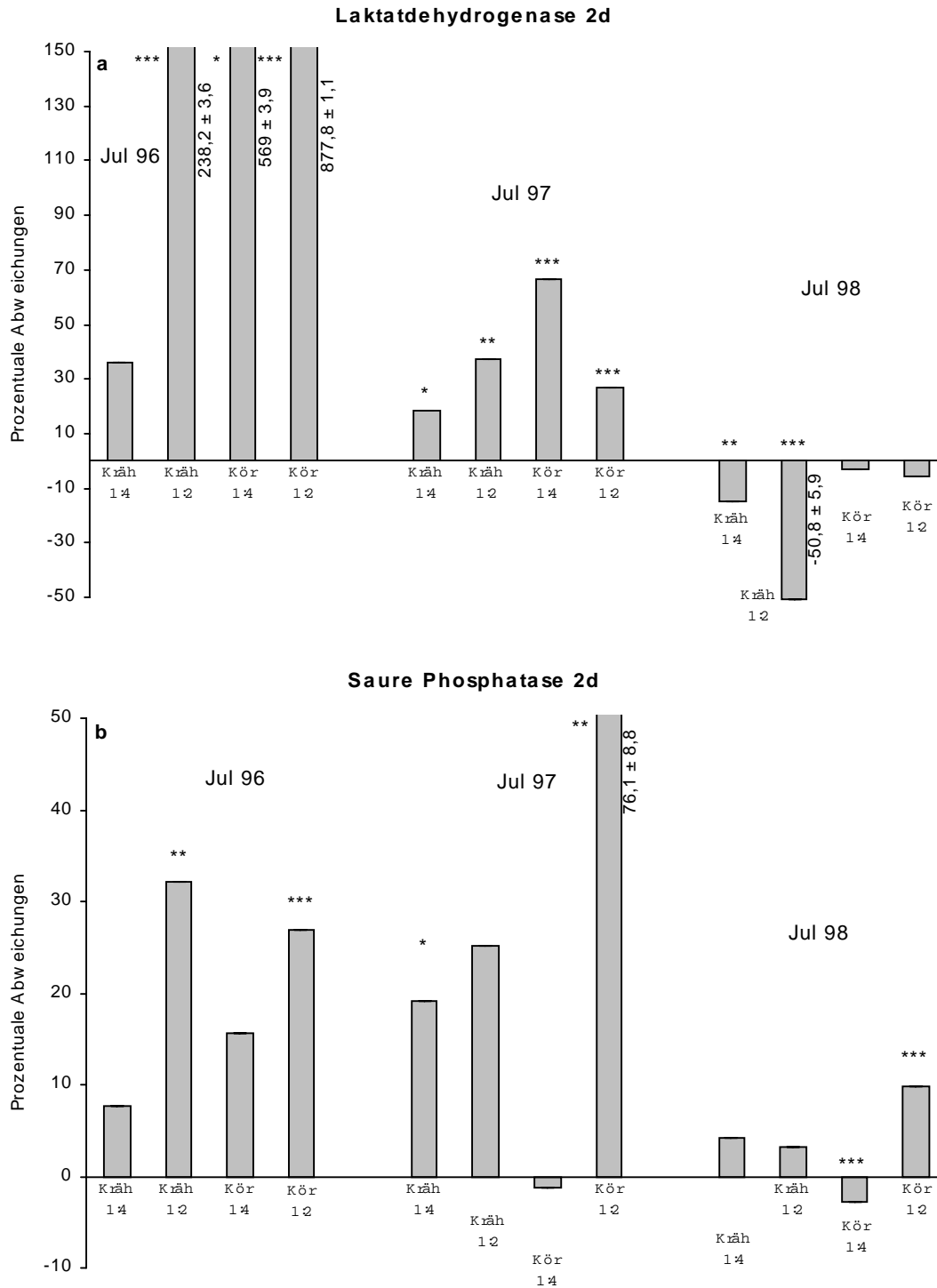


Abb. 4.4: Relative Enzymaktivitäten der cytosolischen Laktatdehydrogenase (a) und Sauren Phosphatase (b) in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit acetonischem Extrakt aus Krähenbach- und Körschsediment. Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 parallelen Ansätzen. Abweichungen von den Kontrollen nach Student's t-Test und Mann-Whitney-Rangsummen-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

wiesen werden (Honnen et al., 1999b). Des weiteren könnten die unterschiedlichen Spendertiere für die Primärhepatocyten und das Handling der Zellen zu den biochemischen Schwankungen beitragen. Schließlich könnten die Gründe auch in einer im Vergleich zur Ultrastruktur schnelleren Reaktionsfähigkeit der biochemischen Endpunkte auf äußere Einflüsse liegen.

Ein Vergleich der untersuchten Modellfließgewässer ergibt folgendes Bild: Die Proben aus der Körsch verursachten stärkere biochemische Abweichungen zu den jeweiligen Kontrollzellen als die Proben aus dem Krähenbach. Beim Vergleich der untersuchten Kompartimente Wasser und Sediment konnten folgende Reaktionsmuster in den belasteten Primärhepatocyten beobachtet werden.

In mit *nativem Wasser* beider Fließgewässer belasteten isolierten Hepatocyten zeigte sich zu den meisten Probennahmen bereits nach 1 d ein z.T. signifikanter Aktivitätsanstieg bzw. Aktivitätsrückgang ausgewählter Stoffwechsellzyme, Biotransformationsenzyme und der Lipidperoxidationsrate. Auffällig war jedoch die meist stärkere Induktion bzw. Hemmung bei mit Körschwasser belasteten Hepatocyten. Diese Daten sind unter dem Aspekt von großer Bedeutung, daß die Aufrechterhaltung der Aktivitäten von Enzymen in isolierten Zellen allgemein als Gütekriterium betrachtet wird (Berry et al., 1991).

Eines der gemessenen Markerenzyme für den glykolytischen Stoffwechselweg der isolierten Hepatocyten ist die cytosolische Laktatdehydrogenase. Sie kommt in allen Geweben vor und dient als verlässlicher Indikator für Streß (Oser, 1965). Einen Aktivitätsanstieg der cytosolischen Laktatdehydrogenase konnte in den mit nativem Wasser beider Fließgewässer exponierten Primärhepatocyten bei fast allen Proben festgestellt werden und läßt auf eine erhöhte Glykolyseaktivität bzw. einen erhöhten Energiebedarf der Zellen schließen. Eine verstärkte Freisetzung der Laktatdehydrogenase ins Medium war bei den meisten Körsch-Wasserproben zu beobachten und weist auf eine Schädigung von Zellmembranen hin (Mitchell et al., 1980). Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu der meist erhöhten Lipidperoxidationsrate in den mit nativem Wasser der Körsch belasteten isolierten Hepatocyten. Die Lipidperoxidation gilt als empfindlicher und rascher Biomarker für den Redoxstatus der Zelle, bei dem über den Anstieg des freigesetzten Malondialdehyd die Peroxidation ungesättigter Membranlipide und damit eine Membranschädigung nachgewiesen wird (Arnold, 1995; Braunbeck, 1995; Zahn, 1995). Weiterhin stieg die Aktivität der Alaninaminotransferase bei beiden Bächen nach 2 tägiger Belastungsdauer in den Hepatocyten an. Rouiller (1964) nimmt an, daß sich erhöhte Alaninaminotransferaseaktivität auf streßbedingte Schädigungen von Mitochondrien zurückführen läßt. Weiterhin weist die gesteigerte Aktivität der Alaninaminotransferase auf einen erhöhten Abbau von Aminosäuren hin und kann als Hinweis auf einen erhöhten Energiebedarf betrachtet werden (Arnold, 1995).

Das bei vielen Oxidationsreaktionen anfallende und Radikale ausbildende Wasserstoffperoxid kann zu drastischen zellulären Schäden führen. Es wird durch die peroxisomale Katalase der Zelle entgiftet (Dekant & Vamvakas, 1994). Der Aktivitätsanstieg der Katalase in den mit Krähenbach und Körsch Wasser belasteten Zellen könnte einer verstärkten Radikalbildung entgegenwirken. Vor allem nach einer Belastungsdauer von 2 d zeigte die Katalase der mit Körsch Wasser exponierten Primärhepatocyten einen drastischen Aktivitätsanstieg.

Wäßrige Eluate sollen eine vollständige Remobilisierung und Oxidation des Sedimentes simulieren (Ahlf, 1995). Dabei werden überwiegend hydrophile Substanzen wieder in Lösung gebracht. Besonders Schwermetalle lassen sich durch wäßrige Elution von Partikeln abtrennen (Calmano et al., 1991), so daß sie sich schädigend auf Zellen auswirken können. Gerade die Sedimente beider Modellfließ-

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

gewässer, vor allem aber der Körsch, zeigen eine kontinuierliche Belastung mit Schwermetallen wie Kupfer, Blei, Cadmium und Zink (Honnen et al., 1999b).

Die mit wäßrigen Sedimenteluaten von Krähenbach und Körsch belasteten Primärhepatocyten zeigten starke Abweichungen der Aktivität zur Kunstwasserkontrolle bei fast allen gemessenen Enzymen sowie bei der Lipidperoxidationsrate. Die Abweichungen waren bei der Körsch meist stärker ausgeprägt. Auffällig war der Rückgang der Aktivität der unspezifischen Esterase in den Zellen nach einer eintägigen Exposition gegenüber wäßrigen Sedimenteluaten der Körsch. Da teilweise auch die Lipidperoxidationsrate zugenommen hatte (Probennahme Juli 1996) sowie die Aktivität der freigesetzten Laktatdehydrogenase erhöht war, läßt sich die Ursache in einer verstärkten Schädigung von Membranen suchen, die mit einer Abnahme der Aktivität membrangebundener Enzyme wie Esterasen oder Monoxygenasen einhergeht (Plaa & Whitschi, 1976).

Des weiteren nahm die Aktivität der Glutathion S-Transferase bei der Probennahme vom Juli 1997 nach 1 d Belastung mit wäßrigen Eluat beider Fließgewässer deutlich ab. Dieser Effekt könnte mit der Zunahme der Lipidperoxidation im Zusammenhang stehen, denn organische Peroxide, die bei der Lipidperoxidation entstehen, vermögen mit Rezeptoren oder Proteinen zu reagieren und so die katalytische Funktion von Enzymen zu hemmen (Younes, 1994). Nach Junqueira et al. (1986) besteht ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Induktion des Cytochrom P-450 Systems und einer erhöhten Lipidperoxidation, bei der vermehrt Sauerstoffradikale und organische Peroxide entstehen. Besonders auffällig war die signifikante Aktivitätszunahme der Katalase sowie der enorme Anstieg der Lipidperoxidationsrate besonders für die Körsch bei der Probennahme Juli 1997.

Porenwasser stellt für viele benthische Lebewesen einen wichtigen Aufnahmeweg für sedimentgebundene Schadstoffe dar (Burton & MacPherson, 1995). Deswegen macht es eine Untersuchung auf ein funktionelles bzw. morphologisches Schädigungspotential dringend erforderlich.

Die mit *Porenwasser* aus Krähenbach und Körschsediment exponierten isolierten Hepatocyten zeigten bereits nach 1 d eine teilweise starke Aktivitätszunahme der gemessenen Enzyme und einen Anstieg der Lipidperoxidationsrate. Ein Vergleich von Krähenbach- und Körschporenwasser ergibt beim größten Teil der gemessenen Enzyme und Lipidperoxidationsrate stärkere Abweichungen zur Kunstwasserkontrolle bei der Körsch.

Neben einer signifikanten Zunahme der Aktivität der cytosolischen und freigesetzten Laktatdehydrogenase sowie der Katalase stieg die Lipidperoxidation vor allem bei der Probennahme vom Juli 1996 und November 1997 deutlich an. Dagegen ging nach 1 d Belastung mit Krähenbach- und Körschporenwasser (Probennahme Juli 1998) als auch nach 1 und 2 d Belastung mit Körschporenwasser (Probennahme Juli 1997) die Aktivität der Sauren Phosphatase auffällig zurück.

Auch diese Veränderungen im Enzymprofil stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit der verstärkten Lipidperoxidation und der daraus resultierenden Zunahme organischer Peroxide. Durch die Lipidperoxidation können lysosomale Membranen aufgebrochen werden (Fong et al., 1973) und in Folge der Freisetzung proteolytischer Enzyme ins Cytoplasma sekundäre pathologische Effekte induziert werden.

Mit **acetonischen Extrakten** lassen sich hydrophobe Schadstoffe aus dem Sediment extrahieren bzw. mobilisieren und auf ihr cytotoxisches Potential hin untersuchen. Durch die Aufkonzentrierung können selbst geringe Mengen an umweltrelevanten Chemikalien in biologischen Testsystemen ein Schadbild ergeben und eine mögliche Bioakkumulation simulieren.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

In mit *acetonischen Sedimentextrakten* aus Krähenbach und Körsch belasteten isolierten Hepatocyten waren bereits nach 1 d bei der niedrigsten Konzentration (13,3 mg Sedimenttrockengewicht pro mL Testansatz) biochemische Effekte zu beobachten.

Eine Belastung der Zellen mit den acetonischen Sedimentextrakten beider Fließgewässer bewirkte bei den Probennahmen Juli 1996 und 1997 mit Ausnahme der Glutathion S-Transferase und Sauren Phosphatase weitgehend einen Aktivitätsanstieg der gemessenen Enzyme. Dagegen nahm die Lipidperoxidationsrate in den belasteten Zellen meist ab, jedoch besitzen die ermittelten Ergebnisse für die Lipidperoxidation aufgrund der hohen Standardabweichung keine Aussagekraft. Wiederum waren die Abweichungen der Enzymaktivitäten und der Lipidperoxidationsrate im Vergleich zur Kontrolle meist stärker bei der Körsch.

Parallel zu den *In vitro*-Tests wurden auch *In vivo*-Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) und Bachschmerlen (*Barbatula barbatula*) im Halbfreilandversuch für mehrere Wochen mit Krähenbach- und Körschwasser exponiert und anschließend die Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme in der Leber gemessen. Ein Vergleich der ermittelten *In vivo*-Befunde mit den *In vitro*-Ergebnissen ergibt kein übereinstimmendes Enzymprofil zwischen dem *In vivo*- und *In vitro*-Testsystem bei beiden Fließgewässern über den gesamten Probennahmezeitraum (Abb. 4.5, 4.6).

Da als Spendertier für die Primärhepatocyten die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) verwendet wurde, könnten die Ursachen für die fehlenden Übereinstimmungen im Enzymprofil zwischen dem *In vivo*- und *In vitro*-Testsystem u.a. in einer spezifischen Reaktion der einzelnen Fischarten liegen. Jedoch waren beim Krähenbach die Übereinstimmungen der ermittelten Enzymaktivitäten zwischen der Leber der Bachforellen und Bachschmerlen einerseits und den mit nativem Wasser belasteten isolierten Hepatocyten häufiger gegeben als bei der Körsch (Abb. 4.5, 4.6). Während beim Krähenbach die Aktivität der Alaninaminotransferase zu den Probennahmen Oktober/November 1995 und Juli/September 1996 sowohl *in vivo* und *in vitro* im Vergleich zur Kontrolle stieg, zeigten die Esterase und die Saure Phosphatase zur Probennahme November 1997 in beiden Testsystemen einen Aktivitätsrückgang (Abb. 4.5, 4.6). Dagegen nahm bei der Körsch die Aktivität der Sauren Phosphatase in der Leber von Bachforelle und Bachschmerle als auch Primärhepatocyten zu den Probennahmen Oktober/November 1995 zu und zu der Probennahme Juli 1997 ab (Abb. 4.5, 4.6). Interessanterweise zeigten die gemessenen Leberenzymaktivitäten der Körsch exponierten Bachschmerlen im Vergleich zu den Bachforellen häufiger Übereinstimmungen zu den Körsch-Wasser belasteten Primärhepatocyten der Regenbogenforelle.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

Tab. 4.5: Vergleich biochemischer Effekte, die in der Leber von Bachforellen, Bachschmerlen und isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle nach Belastung mit Krähenbach- und Körschwasser gefunden wurden (Probenahmen November 1995, 1997).

| Probenahme | Oktober 1995 | November 1995 | Oktober 1995 | November 1995 | November 1997 | November 1997 | November 1997 | November 1997 |
|--|-----------------------|------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| Testsysteme | in vivo Krähenbach | in vitro Krähenbach | in vivo Körsch | in vitro Körsch | in vivo Krähenbach | in vitro Krähenbach | in vivo Körsch | in vitro Körsch |
| In vivo-Vergleich zur Bachforelle (Salmo trutta f. fario) | | | | | | | | |
| Exposition 13 bzw. 24 Wochen | | | | | | | | |
| Alaninaminotransferase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | + | | + | | + | | + |
| Aktivitätsabnahme | | | - | | - | | - | |
| Esterase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | | | | + | | | | + |
| Aktivitätsabnahme | - | - | - | | - | - | - | |
| Katalase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | | | + | | + | | + |
| Aktivitätsabnahme | | - | - | | - | | - | |
| Saure Phosphatase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | + | + | + | + | | | + |
| Aktivitätsabnahme | | | | | | - | - | |
| In vivo-Vergleich zur Bachschmerle (Barbatula barbatula) | | | | | | | | |
| Exposition 13 bzw. 24 Wochen | | | | | | | | |
| Alaninaminotransferase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | + | | + | | + | | + |
| Aktivitätsabnahme | | | - | | - | | - | |
| Esterase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | | + | + | | | | + |
| Aktivitätsabnahme | | - | | | - | - | - | |
| Katalase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | | | + | + | | + | | + |
| Aktivitätsabnahme | - | - | | | - | | - | |
| Saure Phosphatase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | + | + | + | | | | + |
| Aktivitätsabnahme | | | | | - | - | - | |

Vergleichbare Effekte beider Systeme sind grau unterlegt. Eine Zunahme der Enzymaktivität ist mit einem + und eine Aktivitätsabnahme mit einem - unterlegt. Die *In vitro*-Daten beziehen sich auf die geringste Verdünnung (1:3-Verdünnung) des Krähenbach- und Körschwassers nach 2 d Belastungsdauer; n.g. nicht gemessen. In vivo-Daten aus Braunbeck et al., 1996, 1997, 1998.

4. Cytotoxikologische Untersuchungen an Wasser und Sediment: Biochemie

Tab. 4.6: Vergleich biochemischer Effekte, die in der Leber von Bachforellen, Bachschmerlen und isolierten Hepatocytten der Regenbogenforelle nach Belastung mit Krähenbach- und Körschwasser gefunden wurden (Probennahmen Juli 1996, September 1996, Juli 1997).

| Probennahme | Juli 1996 | Juli 1996 | Juli 1996 | Juli 1996 | Juli 1997 | Juli 1997 | Juli 1997 | Juli 1997 |
|--|------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Testsysteme | in vivo Krähenbach | in vitro Krähenbach | in vivo Körsch | in vitro Körsch | in vivo Krähenbach | in vitro Krähenbach | in vivo Körsch | in vitro Körsch |
| In vivo-Vergleich zur Bachforelle (Salmo trutta f. fario) Exposition 12 bzw. 7 Wochen | | | | | | | | |
| Alaninaminotransferase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | + | | + | + | + | | + |
| Aktivitätsabnahme | | | - | | | | - | |
| Esterase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | | + | | | n.g. | | n.g. |
| Aktivitätsabnahme | | - | | - | - | | - | |
| Katalase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | | + | | + | + | + | | + |
| Aktivitätsabnahme | - | | - | | | | - | |
| Saure Phosphatase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | | + | + | + | + | | | |
| Aktivitätsabnahme | - | | | | | - | - | - |
| In vivo-Vergleich zur Bachschmerle (Barbatula barbatula) Exposition 12 bzw. 7 Wochen | | | | | | | | |
| | September in vivo Krähenbach | September 1996 in vitro Krähenbach | September 1996 in vivo Körsch | September 1996 in vitro Körsch | Juli 1997 in vivo Krähenbach | Juli 1997 in vitro Krähenbach | Juli 1997 in vivo Körsch | Juli 1997 in vitro Körsch |
| Alaninaminotransferase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | + | + | + | | + | | + |
| Aktivitätsabnahme | | | | | - | | - | |
| Esterase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | | + | | + | n.g. | | n.g. |
| Aktivitätsabnahme | | - | | - | | | - | |
| Katalase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | + | n.g. | + | + | + | + | | + |
| Aktivitätsabnahme | | | | | | | - | |
| Saure Phosphatase | | | | | | | | |
| Aktivitätszunahme | | + | | + | | | | |
| Aktivitätsabnahme | - | | - | | - | - | - | - |

Vergleichbare Effekte beider Systeme sind grau unterlegt. Eine Zunahme der Enzymaktivität ist mit einem + und eine Aktivitätsabnahme mit einem - unterlegt. Die *In vitro*-Daten beziehen sich auf die geringste Verdünnung (1:3-Verdünnung) des Krähenbach- und Körschwassers nach 2 d Belastungsdauer; n.g. nicht gemessen. In vivo-Daten aus Braunbeck et al., 1997, 1998.

