

# Wirkungsuntersuchungen beim Brassen

Auswahl geeigneter, lagerfähiger Zielkompartimente  
am Beispiel Vitellogenin



Universität Trier, Fachbereich VI – Biogeographie  
im Auftrag des Umweltbundesamtes



Umwelt  
Bundes  
Amt   
Für Mensch und Umwelt

# Wirkungsuntersuchungen beim Brassens

Auswahl geeigneter, lagerfähiger Zielkompartimente  
am Beispiel Vitellogenin

von

Markus Quack & Roland Klein

unter Mitarbeit von

Martina Bartel

Thomas Braunbeck

Bernd Fontaine

Xiaohua He

Martin Paulus

Petra Willems

**Trier, April 2003**

## **Danksagung**

Zur Durchführung des vorliegenden Vorhabens war der Einsatz sehr vieler Personen notwendig. Aus diesem Grund soll es nicht versäumt werden denen zu danken, die zu dem Gelingen dieser Untersuchung mit beigetragen haben.

In diesem Zusammenhang sind insbesondere die zahlreichen wissenschaftlichen Hilfskräfte, die an der Probenahme aktiv mitgearbeitet haben, zu nennen. Namentlich sind dies: Cathrin Bretz, Tanja Hollmann, Diana Teubner, Elisa Roth-Walraf, Björn Hannapel, Armin Liese, Martin Peifer und Thomas Weimann.

Daneben gilt unser Dank Frau Katrin Nentwich sowie den Herren Joachim Krotten, Daniel Hoffmann und Alois Deutsch.

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Notwendigkeit und Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Auswahl der Zielkompartimente .....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Untersuchungen zur Probenahme und Probenbearbeitung von Blutplasma als Einzelprobe .....</b>	<b>10</b>
	3.1 Grundlagen .....	10
	3.2 Betäubung des Fisches .....	10
	3.3 Blutentnahme .....	12
	3.4 Kompartimentauswahl .....	16
	3.5 Zusatzstoffe .....	17
	3.5.1 Antikoagulanzen .....	18
	3.5.2 Proteinaseinhibitor .....	20
	3.6 Probenbehandlung und -lagerung .....	22
<b>4</b>	<b>Untersuchungen zur Probenahme und Probenbearbeitung Milz als Einzelprobe .....</b>	<b>24</b>
	4.1 Grundlagen .....	24
	4.2 Entnahme der Milz .....	25
	4.3 Probenbehandlung und -lagerung .....	25
<b>5</b>	<b>Erstellung von <i>standard operating procedures</i> (SOPs) .....</b>	<b>30</b>
	5.1 Blutplasmaprobenahme – Ergänzung der SOP Brassen .....	31
	5.1.1 Zielkompartimente .....	31
	5.1.2 Durchführung der Probenahme .....	31
	5.2 Milzprobenahme – Ergänzung der SOP Brassen .....	32
	5.2.1 Zielkompartimente .....	33
	5.2.2 Durchführung der Probenahme .....	33
<b>6</b>	<b>Durchführung von Blutplasma- und Milzprobenahmen im Jahr 2002 .....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>Vtg-Untersuchungen mittels Immuno-Assay (ELISA) .....</b>	<b>36</b>
	7.1 Vorbemerkungen .....	36

---

7.2 Methoden .....	37
7.3 Ergebnisse .....	39
7.4 Diskussion der Ergebnisse .....	44
<b>8 Histologische Untersuchungen der Gonaden der im Jahr 2002 beprobten Brassen .....</b>	<b>48</b>
8.1 Methoden .....	49
8.2 Vorbemerkungen.....	50
8.2.1 Normalstruktur des Hodens von Cypriniden .....	50
8.2.2 Normalstruktur der Ovarien von Cypriniden.....	51
8.3 Ergebnisse .....	52
<b>9 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse der Vtg-Analysen und der histologischen Untersuchung.....</b>	<b>67</b>
<b>10 Zusammenfassung und Empfehlungen für die Probenahme.....</b>	<b>68</b>
<b>11 Literatur.....</b>	<b>71</b>

## Anhang

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Prinzip des geschlossenen Blutentnahmesystems mittels S-Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht) .....	13
Abb. 2:	Anatomie des Brassen - Die Lage des Herzens ist mit dem Pfeil gekennzeichnet .....	13
Abb. 3:	Blutentnahme mittels Herzstich durch die Kiemenwand .....	14
Abb. 4:	Blutmenge pro Individuum der in der Saar und Mosel untersuchten männlichen Brassen (Median, Perzentile nach SPSS) (aus BARTEL et al. 2002) .....	15
Abb. 5:	Strukturformel von Heparin.....	18
Abb. 6:	Abhängigkeit der mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration von der Heparin-Darreichungsform in männlichen Brassen.....	19
Abb. 7:	Abhängigkeit der mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration von der Heparin-Darreichungsform in weiblichen Brassen .....	20
Abb. 8:	Abhängigkeit der mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration vom Zusatz von Aprotinin im Blut männlicher Brassen .....	21
Abb. 9:	Abhängigkeit der mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration vom Zusatz von Aprotinin im Blut weiblicher Brassen.....	22
Abb. 10:	Einfluss der Einfriertechnik auf die mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration im Blut männlicher Brassen .....	23
Abb. 11:	Einfluss der Einfriertechnik auf die mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration im Blut weiblicher Brassen.....	24
Abb. 12:	Standardkurve zur Auswertung der Vtg-Konzentrationen.....	38
Abb. 13:	B&W-Plots der Vitellogeningehalte [ $\mu\text{g/ml}$ ] der untersuchten männlichen (links) und weiblichen Tiere (rechts) von allen Probenahmeflächen.....	39
Abb. 14:	Histogramm der ermittelten Vitellogeningehalte (männliche Tiere) (<NG = kleiner Nachweisgrenze) .....	40
Abb. 15:	B&W-Plots der Vitellogeningehalte [ $\mu\text{g/ml}$ ] nach Standorten (männliche Tiere).....	41
Abb. 16:	Histogramm der ermittelten Vitellogeningehalte (weibliche Tiere) (<NG = kleiner Nachweisgrenze) .....	42
Abb. 17:	B&W-Plots der Vitellogeningehalte [ $\mu\text{g/ml}$ ] der weiblichen Tiere nach Standorten .....	43
Abb. 18:	B&W-Plots der Vitellogeningehalte [ $\mu\text{g/ml}$ ] der weiblichen Tiere nach Standorten (getrennt nach sichtbarer Erscheinung der in Gonaden enthaltenen Eiern = rot; grau = ohne Bemerkungen) .....	44
Abb. 19:	Ergebnisse der Vtg-Analyse [ $\mu\text{g/ml}$ ] in Brassen der Saar (BARTEL et al. 2002) .....	45
Abb. 20:	Histologie des Teleosteer-Hodens und der die Spermatogenese durchlaufenden Zellstadien am Beispiel des Männchens Jochenstein 17 (250x, Goldner-Färbung) .....	50
Abb. 21:	Histologie des Ovars der Teleosteer am Beispiel des Weibchens Ulm 9 (160x, Goldner-Färbung).....	52
Abb. 22:	Reifestufen männlicher Gonaden (n=145) (0 = völlig inaktiv, 1 = unreif, 2 = regelmäßig Spermatozyten, 3 = Spermatiden, 4 = reif).....	57
Abb. 23:	Mischgonade in Tier 14 der Probenahmefläche Blankenese (250x, H&E-Färbung), Oozyten sind mit Pfeilen gekennzeichnet.....	59

---

Abb. 24:	Encystierte Eizelle in Tier 13 der Probenahme­fläche Güdingen (250x, Goldner-Färbung) 60	
Abb. 25:	Verstärkte Bindegewebsausprgung und Fibrose (grün-blau) in Tier 14 der Probenahme­fläche Güdingen (250x, Goldner-Färbung) .....	61
Abb. 26:	Prozentualer Anteil des Fibrosegrades [%] innerhalb der Gesamtstichprobe einer Probenahme­fläche .....	62
Abb. 27:	Nekrotische Tubuli in Tier 4 der Probenahme­fläche Kelheim (250x, Goldner-Färbung)..	63
Abb. 28:	Prozentualer Anteil des Nekrosegrades [%] innerhalb der Gesamtstichprobe einer Probenahme­fläche .....	64
Abb. 29:	Individuum 19 (weiblich) der Probenahme­fläche Koblenz mit vereinzelt auftretenden atretischen Eiern (links oben = Zyste) (160x, Goldner-Färbung).....	66

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Für Biomarker-Untersuchungen und für genetische Charakterisierung in Frage kommende Zielkompartimente (schwarze Punkte) sowie die für chemische Analysen derzeit gelagerte Zielorgane (weiße Punkte) vom Brassen (aus KLEIN 2003).....	6
Tab. 2:	Formulierung von Dulbecco's Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (nach GIBCO, Karlsruhe).....	26
Tab. 3:	Formulierung des RPMI 1640 Mediums (nach GIBCO, Karlsruhe) .....	27
Tab. 4:	Abhängigkeit der relativen „Überlebenswahrscheinlichkeit“ (Trypan Blue Exclusion) von Ratten-Hepatozyten von der Einfriergeschwindigkeit (nach HENGSTLER et al. 2000a) ....	29
Tab. 5:	Stichprobengrößen der untersuchten Parameter bei den Routine-Probenahmen 2002 in Rhein, Elbe, Saale, Mulde, Saar und im Screening Donau 2002.....	35
Tab. 6:	Mittelwerte und Standardabweichungen der nach PNFs aufgeschlüsselten Vtg-Gehalte in männlichen Brassen .....	42
Tab. 7:	Ergebnisse der histologischen Untersuchung der männlichen Tiere .....	54
Tab. 8:	Durchschnittlicher Reifegrad der Gonaden der männlichen und weiblichen Tiere der untersuchten Probenahmeflächen (sortiert nach Probenahmeterminen).....	58
Tab. 9:	Prozentualer Anteil der Fibroseklassen (0=fehlend bis 4=massenhaft) an der Gesamtstichprobe einer Probenahmefläche (gerundet) sowie prozentualer Anteil als fibrotisch charakterisierter Individuen .....	62
Tab. 10:	Prozentualer Anteil der Nekroseklassen (0=fehlend bis 3=sehr häufig) an der Gesamtstichprobe einer Probenahmefläche (gerundet) sowie prozentualer Anteil als nekrotisch charakterisierter Individuen .....	65
Tab. 11:	Ergebnisse der histologischen Untersuchung der weiblichen Tiere.....	66

## **Investigations of effects on Bream – Vitellogenine as example for selection of suitable storable target compartments**

### ***Abstract***

Up to now, samples of the German Environmental Specimen Bank (ESB) are analysed on concentrations of chemical substances only. Therefore, statements about exposition and bioavailability are not possible, and questions on cause and effect or on the relevance of availability for organisms cannot be answered completely. For this reason we established methods for environmental effect monitoring on the basis of ESB samples, from the selection of suitable organic compartments, the description of methods, to an exemplary analysis.

Because of the complexity of immunological, hormonal and genetic systems and the poor knowledge about suitable marker systems, retrospective analyses are here of special interest. Regarding the continuous specification of methods, the delivery of high-quality samples stored under stable conditions is an important aim of the ESB.

In this context, we exemplarily tested methods for the sampling and storing of specific compartments of bream (*Abramis brama*). Blood plasma, the most important medium of transport, and spleen as a representative of body tissue were chosen. Both compartments were sampled during the ESB routine samplings in the Rivers Saar, Rhine, Elbe, Mulde, Saale and Danube in 2002.

For blood plasma sampling, a variety of methods for fish anaesthetisation, methods for taking blood samples, different additives to blood plasma, and methods of further sample preparation were tested. According to the results of these tests the samples were analysed for vitellogenin (vtg) by means of an ELISA-assay. The results of the vtg assay showed that only at 3 of 16 sampling sites estrogenic effects could be detected. In general, no adverse endocrine effects could be observed in the individuals studied. Nevertheless, because of the simple and fast sampling method and because of the high information level (e.g. for immunological effects), we suggest that blood plasma should be included in the concept of ESB for retrospective effect assessment of animals.

For body tissue or organs, suitable methods for sampling and sample preparation could be developed. The methods were evolved for spleen but can also be applied to any other organ without methodological changes necessary.

To obtain additional information on estrogenic effects, male gonads were analysed for pathological changes. Structural or pathological changes (e.g. occurrence of an ovotestis) can be discussed as indicators for endocrine disruptors, but only 1 of 145 individuals exhibited an ovotestis. Since effects of endocrine disruptors may be superposed by other

pathological effects, these have also been analysed systematically. The frequent occurrence of fibrocytes and necrotic cells at some sampling sites are hints on pollution. It can be assumed that these findings indicate reduced reproductive abilities of the animals studied.

In summary, the results of the vtg assay as well as the histological examinations confirm that there is no evidence for endocrine effects on the level of population. However, it is suggested that histological analyses should be repeated in specific intervals. Collecting, fixing and storing samples of male gonads could be easily included in the ESB routine. The very informative histo-pathological analyses could be carried out even retrospectively.

# 1 Notwendigkeit und Zielsetzung

Die Proben der Umweltprobenbank des Bundes werden zur Zeit, entsprechend dem klassischen Ansatz umwelttoxikologischer Untersuchungen, lediglich auf Konzentrationen chemischer Stoffe untersucht, wodurch Aussagen zur Exposition und Bioverfügbarkeit, aber nicht zur Wirkung möglich sind. Die Frage nach der Kausalität (Ursache-Wirkung) bleibt dadurch letztendlich genauso unbeantwortet wie diejenige nach der Relevanz bioverfügbarer Stoffe für Lebewesen. Deshalb fordert nicht nur WEEKS (1998, S. 653), dass „a link must be established between exposure and biological effect. This is the area of greatest uncertainty in hazard assessment“. Damit ist die Notwendigkeit, die in den Medien und/oder Organismen gemessenen Gehalte chemischer Substanzen mit bestimmten Effekten verknüpfen zu müssen, sehr deutlich zum Ausdruck gebracht.

Aussagen zu Wirkungen chemischer Substanzen auf biologische Systeme lassen sich prinzipiell auf allen Ebenen der biologischen Organisation (vom Molekül bis zur Biozönose) untersuchen. Allerdings unterscheiden sich die Organisationsstufen sowohl in Bezug auf ihre Indikationsleistung als auch in Bezug auf ihre Fähigkeit, in das Konzept der Umweltprobenbank des Bundes integriert werden zu können. Ohne die Unterschiede bezüglich der Indikationsleistung im Rahmen dieses Berichtes ausführlich diskutieren zu können bzw. im Hinblick auf die UPB zu müssen (vgl. z.B. KLEIN 2003), bestehen sie kurz gesagt darin, dass auf den höheren Ebenen der biologischen Organisation die Umweltrelevanz der Aussagen am höchsten ist, während auf den unteren die Sicherheit der Zuordnung zwischen chemischer Substanz und Effekt am besten und sichersten sichtbar gemacht werden kann. Im Hinblick auf die Integration in das Konzept der UPB scheiden die höheren Ebenen für Wirkungsuntersuchungen aus, da hier keine lagerfähigen Proben gewonnen werden können. Deshalb bieten sich für die UPB insbesondere die unteren Ebenen an, die z.B. mit dem Biomarker-Ansatz in Bezug auf Wirkungen analysiert werden können. Zugleich bietet dieser Ansatz auch die Möglichkeit, lagerfähige Proben zu gewinnen und somit in das Konzept der UPB integriert werden zu können.

Biomarker können für verschiedene biologische Systeme der unteren Ebenen biologischer Organisation definiert werden, wobei je nach System die Etablierung geeigneter und zuverlässiger Marker zum jetzigen Zeitpunkt unterschiedlich weit fortgeschritten ist. Gerade dieser Aspekt liefert einen weiteren Ansatzpunkt, Proben für Biomarker-Untersuchungen bereits jetzt in die UPB zu integrieren, weil sie zu einem späteren Zeitpunkt mit verbesserten Markern retrospektiv untersucht werden können. Beispielhaft sollen im Folgenden drei biologische Systeme kurz beschrieben werden, um die Leistungsfähigkeit von Biomarkern, d.h. die daraus ableitbaren Aussagen zur Wirkung von Stoffen zu verdeutlichen.

## **Immunsystem**

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor fremden Stoffen zu schützen. Leukozyten (weiße Blutkörperchen) verschiedenster Art bilden die Basis des Immunsystems, das bezüglich seiner Funktion entweder nach zellulärer und humoraler (*humor* = lat. Flüssigkeit) oder nach angeborener und angepasster Immunabwehr unterschieden werden kann.

Chemische Substanzen, die vom Körper aufgenommen werden, können an allen möglichen Komponenten des Immunsystems Veränderungen bewirken, die sowohl zu einer Immunsuppression als auch -stimulation führen können. Aufgrund der bereits erwähnten Komplexität des Immunsystems und der selektiven Wirkung chemischer Substanzen genügt ein Marker nicht, um ihre Auswirkungen zu erfassen (LUSTER et al. 1994). Es ist vielmehr eine Testbatterie notwendig, mit der die verschiedenen Strukturen und Funktionen der Immunantwort repräsentiert werden können (IDEL & STILLER-WINKLER 1997, KRZYSTYNIAK et al. 1998, COLOSIO et al. 1998). Das größte Problem besteht hierbei darin, dass es eine Vielzahl unterschiedlicher Test- und Untersuchungsverfahren gibt, die alle mit methodischen Problemen behaftet sind. Für den Einsatz von Markern im Biomonitoring empfehlen daher RICE et al. (1996) die Untersuchungen auf einfache und relativ kostengünstige Assays der Immunfunktion zu beschränken. Hierzu zählen bei Fischen zum Beispiel Tests zur angeborenen, unspezifischen Immunität an Zellen der Milz und Kopfnieren, wie die Ermittlung der Phagozytose-Aktivität oder der Aktivität der natürlichen Killerzellen gegen bestimmte Antigene.

Aufgrund der Bedeutung des Immunsystems für den Organismus und damit letztendlich für Populationen ist seine Untersuchung im Rahmen der UPB unabdingbar, um Wirkungen chemischer Substanzen auf biologische Systeme sichtbar zu machen. Gerade die diskutierten Probleme und die unzureichende Kenntnis des Immunsystems erfordern Überlegungen zum Lagern geeigneter Umweltproben zum jetzigen Zeitpunkt für spätere Analysen.

## **Hormonsystem**

In den letzten Jahren bzw. Jahrzehnten wurden sowohl in der Natur als auch beim Menschen Veränderungen verschiedenster Art beobachtet, die auf Beeinträchtigungen des endokrinen Systems bzw. des Fortpflanzungssystems durch in der Umwelt befindliche Chemikalien hindeuten. Diese Chemikalien werden als Xeno-Östrogene bzw. Xeno-Androgene oder allgemein als Umwelthormone bezeichnet. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Körper wie die eigentlichen Sexualhormone wirken bzw. deren Aktivität verändern. Dies geschieht indem Chemikalien in der Zelle an denselben Rezeptor binden wie die Steroide (EISENFELD et al. 1980). Dadurch sind sie in der Lage, die Effekte der

Steroide nachzuahmen und die Wirkungen der natürlichen Hormone zu unterbinden, da sie den Rezeptor blockieren.

Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass die aus Fremdstoff und Rezeptor gebildeten Komplexe nicht völlig identisch mit den natürlichen Hormon-Rezeptor-Komplexen sind. Entsprechend können sie an den verschiedenen **Response Elements (RE)** der DNA andere Bindungseigenschaften zeigen und eventuell auch mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren. Auf diese Weise ist es möglich, dass die von Hormonen und hormonaktiven Chemikalien erzielten Wirkungen verschieden sein können.

Zum anderen können Umwelthormone die Anzahl der Rezeptoren in der Zelle verändern, also indirekt über mehr oder weniger Bindungsstellen für Sexual- bzw. Umwelthormone wirksam sein.

Schließlich können Chemikalien auch über Beeinträchtigungen anderer physiologischer Parameter indirekt hormonell wirken. Ein Beispiel dafür ist die Verbindung des endokrinen Systems mit dem MFO-System. Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen wie die Aromatase oxidieren beispielsweise Testosteron zu Östradiol. Wird die Aktivität dieser Cytochrome gehemmt, wie dies durch Tributylzinn geschehen kann, reichert sich Testosteron an und es wird zu wenig Östradiol gebildet. Dieser Prozess könnte für die Vermännlichung bestimmter Schneckenarten verantwortlich sein (z.B. OEHLMANN et al. 1995).

Mittlerweile ist von mehr als 100 Chemikalien bekannt, dass sie östrogen wirksam sind. Da die Effekte je nach Chemikalie, Konzentration, Tierart und Entwicklungsstadium sehr verschieden sind, ist es schwierig, allgemeine Aussagen abzuleiten. Hinzu kommt, dass der Gesamtprozess noch unzureichend verstanden wird und standardisierte Testverfahren bis auf wenige Ausnahmen fehlen. Es liegen derzeit nur wenige Biomarker (z.B. Vitellogenin) vor, denen eine ausreichende Eignung zur Darstellung der hormonellen Wirksamkeit zugesprochen werden kann. Gerade diese Tatsache muss als Argument für die Integration von Proben, die für die Untersuchung hormoneller Marker geeignet sind, in die UPB angeführt werden. Wenn aus den bisherigen Erkenntnissen heraus potenziell geeignete Organe oder Körperflüssigkeiten eingelagert werden, kann dann, wenn in einigen Jahren verbesserte Testverfahren und Biomarker vorliegen, rückblickend die Entwicklung der hormonellen Wirkung verfolgt werden.

### **Genetisches System**

Wirkungen stofflicher Stressoren können auf verschiedenen Ebenen des genetischen Systems stattfinden: Genom, Chromosomen und Gene.

Genotoxische Substanzen sind aufgrund ihrer elektrophilen Eigenschaften DNA-reaktiv. Das bedeutet, dass sie mit der DNA kovalente Bindungen eingehen. Hierzu zählen unter

anderem die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH), aromatische Amine, alkylierende Substanzen (z.B. Nitrosamine), anorganische Substanzen (z.B. Metalle), und natürlich in der Umwelt vorkommende Substanzen wie zum Beispiel die Aflatoxine (Pilzgifte). Während beispielsweise Metalle direkt auf die DNA einwirken, müssen andere Verbindungen, wie zum Beispiel PAHs, erst über das Monooxygenase-System aktiviert werden. Das bedeutet, dass bei der Metabolisierung reaktive Zwischenprodukte gebildet werden können, die dann mit der DNA interagieren. Diese Bindungen an die DNA können schließlich die Initialisierung von Tumoren bewirken.

Der am besten untersuchte Biomarker auf der zellularen und molekularen Ebene ist die Adduktbildung, auch wenn nicht alle Fragen in Bezug auf ihren Einsatz als zuverlässiger Biomarker beantwortet sind. Für schnell metabolisierte Stoffe und für elektrophile Substanzen, die vom Organismus aus seiner Umwelt aufgenommen werden, stellen sie einen Indikator für die Exposition gegenüber solchen Substanzen dar. Im Vergleich zum Einsatz des Monooxygenase-Systems als Biomarker liefern Addukte bezüglich der PAH eine weniger sensitive aber dafür spezifischere Indikation, da sie sich nur auf die reaktiven Metabolite bezieht. Da es möglich ist, spezifische Addukte zu identifizieren – wenn auch oft mit erhöhtem Aufwand – kann die Adduktbildung allgemein als spezifisch bezeichnet werden. Addukte können in Bezug auf die Tumorbildung und in Bezug auf mutagene Wirkung als Frühwarnsystem eingesetzt werden.

Unter Betrachtung der genannten Systeme und weiterer, hier nicht näher aufgeführter Systeme, wie z.B. dem Cytochrom P450-Oxygenase-System, stellt sich die Frage, welche Kompartimente für eine langfristige Lagerung geeignet sind, um Untersuchungen von Wirkungen chemischer Substanzen durchführen zu können. Das nachfolgende Konzept wird am Beispiel des Brassens aufgebaut, der sich als hervorragender Bioindikator für limnische Ökosysteme erwiesen hat.

### **Ziele des Vorhabens**

Im Rahmen des vorliegenden Vorhabens soll am Beispiel des für Brassens dargelegt werden, welche (weiteren) Körper-Kompartimente als Einzellagerproben für Wirkungsanalysen geeignet sind. An diese Auswahl anschließend soll für die ausgewählten Kompartimente im Sinne einer Machbarkeitsstudie geprüft werden, ob und nach welcher methodischen Vorgehensweise eine dauerhafte Probenahme dieser Kompartimente im Rahmen der Routineprobenahme möglich ist. Als Endpunkt dieser Untersuchungen sollte die bestehende Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassens (KLEIN & PAULUS 1996) in entsprechender Weise ergänzt bzw. fortgeschrieben werden (vgl. KLEIN et al. 2003).

Untersuchungen auf Vitellogenin (Vtg) als einem relativ zuverlässigen Biomarker für hormonelle Wirkungen sollen dabei beispielhaft den Zugewinn an Information über den stofflichen Zustand der Umwelt aufzeigen. Der Nachweis von Vtg in männlichen Brassen, welche diese Vorläufersubstanz der Dotterproteine natürlicherweise nicht bilden, wird als sicherer Hinweis auf die Anwesenheit von endokrin wirksamen Substanzen in der Umwelt angesehen. Vtg wurde deshalb ausgewählt, weil es zum einen vergleichsweise einfach nachzuweisen ist, und zum anderen auch für das Konzept der UPB einen bedeutenden Parameter darstellt. Die Analysen werden mit Hilfe eines ELISA durchgeführt. Auf die zusätzlich geplante Vtg-Analyse der Leber mittels RT-PCR wurde nach Rücksprache mit Experten verzichtet, da die Ergebnisse der RT-PCR die ELISA-Verfahren lediglich bestätigen bzw. ergänzen, nicht aber verbessern können. Statt dessen wurde angestrebt, die Gonaden der bei den Probenahmen 2002 beprobten männlichen Individuen histologisch auf strukturelle Veränderungen zu untersuchen. Strukturelle Veränderungen werden in diesem Zusammenhang als Marker für hormonelle Wirkung bewertet.

## 2 Auswahl der Zielkompartimente

Da die in der Konzeption der UPB festgeschriebene Sammlung von Homogenatproben die große individuelle biologische Variabilität innerhalb der Stichprobe nicht berücksichtigen kann, sind die zur Zeit vorliegenden Proben mit einem großen Informationsverlust behaftet bzw. für Wirkungsuntersuchungen nur sehr eingeschränkt bzw. nicht verwendbar. Einzelproben werden zur Zeit lediglich zur Erfassung der Variabilität von Stoffgehalten innerhalb einer Population im Screening gewonnen. Um Wirkungen von Stoffen auf Organismen und Populationen feststellen zu können, muss dieses Konzept um Einzelproben erweitert werden.

Aus diesen Vorüberlegungen stellt sich die Frage, welche Kompartimente des Brassen für die Wirkungsuntersuchung besonders geeignet sind. Für die Umweltprobenbank ist die Frage nach den einzulagernden Proben bedeutsamer als die Frage der zu analysierenden Wirkung bzw. des zu analysierenden Biomarkers (KLEIN 2003). Das bedeutet, dass als Ausgangspunkt für die Auswahl geeigneter Zielorgane nicht in erster Linie die Biomarker selbst genommen werden, sondern die biologischen Systeme, die es durch Biomarker zu repräsentieren gilt. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass auch bei Weiterentwicklungen von Biomarkern, die aufgrund der intensiven Forschungstätigkeiten in diesem Bereich zu erwarten sind, geeignete Proben zur Verfügung stehen (KLEIN 2003). Tab. 1 gibt einen

Überblick über generell für Biomarker-Untersuchungen geeignete Körperkompartimente. Sie sollen die Basis für die Diskussion der Auswahl eines Sets an Zielkompartimenten darstellen. Zusätzlich sind in der Tabelle die bisher vom Brassens in der Umweltprobenbank gelagerten Zielorgane für die chemische „Rückstandsanalytik“ aufgeführt sowie diejenigen, welche für die genetische Charakterisierung verwendet werden können.

**Tab. 1: Für Biomarker-Untersuchungen und für genetische Charakterisierung in Frage kommende Zielkompartimente (schwarze Punkte) sowie die für chemische Analysen derzeit gelagerte Zielorgane (weiße Punkte) vom Brassens (aus KLEIN 2003).**

	Leber	Blut	Gonaden	Milz	Kopfnieren	Muskulatur
Cytochrom-P450	●					
Hormonelle Wirkung		●	●			
Immunität		●		●	●	
DNA-Schäden	●					
Genetische Charakt.	●	●	●	●	●	●
Stoffe	○					○

Nach KLEIN (2003) stellen v.a. Leber, Blut, Gonaden, Milz und Kopfnieren Probenmaterialien mit hohem Informationsgehalt für die Wirkungsindikation dar. In der Folge werden diese Kompartimente in ihrer Eignung als Lagerprobe im einzelnen kurz betrachtet.

## Leber

Die Leber ist durch ihre Beteiligung an Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel das zentrale Stoffwechselorgan. Hier werden Eiweiße zu körpereigenen Stoffen, wie z.B. Hormone, Hämoglobin oder auch Vitellogenin, umgebaut. Eine weitere wichtige Aufgabe erfüllt die Leber mit der Entgiftung (z.B. auch Ammoniakentgiftung). Weiterhin ist die Leber ein wichtiges Speicherorgan und dient in Verbindung mit der Galle auch der Exkretion von Stoffen.

Aufgrund der zentralen Stellung im Stoffwechsel und ihrer Eigenschaft als wichtiger Entgiftungsort erscheint die Leber für Wirkungsuntersuchungen sehr gut geeignet. Dementsprechend hat die Zahl wirkungsbezogener Untersuchungen an der Leber in den letzten Jahren stetig zugenommen. Dies beinhaltet neben Enzymuntersuchungen, wie beispielsweise zum Cytochrom P-450 (LIVINGSTONE & GOLDFARB 1997, ROOS et al. 1997, GRYMLAS 1997, FENT 1998), auch Analysen zur Wirksamkeit ausgewählter Stoffe hinsichtlich der Beeinflussung von DNA-Schäden und der Bildung von DNA-Addukten (SIKKA et al. 1990,

NISHIMOTO & VARANASI 1995). Die Leber wird ebenfalls zur Bestimmung hormonell wirksamer Substanzen zunehmend verwendet (vgl. VERSONNEN et al. 1999).

Der Verwendung der Leber als Lagerprobe für wirkungsorientierte Untersuchungen steht zur Zeit allerdings im Wege, dass sie in der UPB als Routineprobe verwendet wird und dementsprechend alle seziierten Lebern vollständig der Homogenatprobe zugeführt werden. Da eine Anfertigung von Leber-Einzelproben ohne Reduzierung der Homogenatprobe nicht möglich gewesen wäre, wurde auf die Auswahl der Leber als Zielkompartiment zur Zeit noch verzichtet. Wenn somit die Leber in vorliegender Untersuchung nicht berücksichtigt wurde, so konnte die methodische Vorgehensweise zur Probenbehandlung und -lagerung für wirkungsorientierte Analysen doch ausreichend geklärt werden, da die in der Folge am Beispiel der Milz erarbeiteten Aussagen zur Lagerung von Gewebeproben auch für die Gewinnung von Leberproben zutreffend sind.

## **Blut**

Dem Blut kommt in allen tierischen Organismen eine zentrale Bedeutung zu. Da es als wichtigstes Transportmedium für die Verteilung aller Substanzen im Körper verantwortlich ist, kann es für zahlreiche Untersuchungen herangezogen werden. Dies beinhaltet sowohl hormonelle als auch immunologische und genotoxische Untersuchungen (z.B. Plasma-Steroid-Konzentrationen, Antikörpernachweis im Blutplasma). Blut besteht zu etwa 55% aus eiweißreichem Plasma und zu etwa 44% aus Erythrozyten. Leukozyten und Thrombozyten machen weniger als 1% aus. Die Aufgabe des Bluts ist die Konstanthaltung des inneren Milieus: Neben Sauerstoff werden auch Glucose, Aminosäuren und Fettsäuren transportiert. Natrium, Kalium und andere Salze regulieren die Flüssigkeitsmenge und den pH-Wert. Auch Zellen des Abwehrsystems und Substanzen, die für die Blutstillung nötig sind, finden sich im Blut. Steroide, Amine, Peptide und Proteine werden als Systemhormone über den Blutweg zu und von den Zellen transportiert.

Das Blut wurde aufgrund seines hohen Informationsgehaltes für die Indikation von Wirkungen und der bisher gesammelten Erfahrungen als UPB-Probe sowohl in der Humanprobenbank (ECKARD & MÜLLER 1996) als auch in der Teilbank Umweltproben (Zusatzprojekt 2001: *Umweltproben zur Untersuchung von Wirkungen in Ökosystemen am Beispiel hormonell wirksamer Substanzen*) untersucht. Aufgrund guter Lagereigenschaften wurde als Kompartiment das Blutplasma ausgewählt (vgl. Kap. 3.4). Die methodische Vorgehensweise zur Gewinnung einer Einzelprobe wurde in umfassenden Untersuchungen erarbeitet und ist in Kap. 3 erläutert. Die zusammenfassende Arbeitsanleitung für die Probenahme von Blutplasma als Einzelprobe im Sinne der UPB ist in Kap. 5.1 dargestellt. Zur beispielhaften Überprüfung der Qualität einer nach diesen Methoden gewonnenen Einzelprobe und zur Überprüfung der Eignung als Wirkungsindikator wurde Blutplasma-

Probenahmen mit nachgeschalteter Vitellogenin-Analyse an allen im Jahr 2002 beprobten Brassern durchgeführt (vgl. Kap. 7). Vtg wurde deshalb als Wirkparameter ausgewählt, weil es als vergleichsweise bekannter und einfach zu analysierender Marker gilt (FOLMAR et al. 1996, ARUKWE et al. 2001a, ARUKWE et al. 2001b) und aus dem o.g. im Jahr 2001 durchgeführten Zusatzprojekt bereits erste Informationen zu bemerkenswerten Vtg-Gehalten in Brassern an den saarländischen UPB-Probenahmeflächen Güdingen und Rehlingen vorlagen.

## **Milz**

Die Milz hat durch ihre Funktionen als Blutfilter und als Organ zur Blutspeicherung für Blut- und Lymphbahn eine wichtige Aufgabe in der Immunabwehr. Sie baut die Erythrozyten ab und bildet in den Lymphknötchen ihres Gewebes neben Lymphozyten auch Antikörper gegen Infektionskrankheiten. Insbesondere bei Fischen bieten sich Milz und Kopfniere als hämatopoetische Systeme zur wirkungsbetrachteten Untersuchung an. In immunologischen Tests mit Leukozyten hat sich v.a. bei Fischen die Milz als Zielorgan bewährt (O'HALLORAN et al. 1998). Diese ist als wichtigster Reifungsort der Immunozellen für die Immunität mitverantwortlich und findet somit häufigen Einsatz in immunologischen Tests.

Aus diesen Gründen wurde die in den Routineprobenahmen an Brassern üblicherweise seziierte und gewogene, anschließend aber verworfene Milz als Einzelprobe für mögliche Wirkungsuntersuchungen in die nähere Betrachtung einbezogen. Die Vorgehensweise zur Beprobung der Milz als Einzelprobe für retrospektive Analysen ist in den Kap. 4 und 5.2 dargestellt. Angemerkt werden muss hier, dass es sich bei der methodischen Vorgehensweise zur Einlagerung der Milz um ein allgemein für Gewebeproben geeignetes Verfahren handelt. Dieses ist ohne Veränderung auch für die Einlagerung von Leberproben als Lagerprobe für Wirkungsanalysen geeignet.

## **Gonaden**

Die Gonaden sollten als geeignete Zielorgane trotz fehlender zuverlässiger Marker aufgrund ihrer Bedeutung für die Fortpflanzung nicht unberücksichtigt bleiben (KLEIN 2003). Insbesondere im Bereich der hormonellen Wirkung erscheint die Betrachtung der Gonaden von entscheidender Bedeutung. Der Reifegrad, die Entwicklung (z.B. Gonadosomatischer Index, GSI) und mögliche Veränderungen in der Sexualdifferenzierung stellen Marker für die endokrine Wirkung von Chemikalien dar. (ANKLEY et al. 1998).

Aus diesem Grund wurden bei den im Jahr 2002 durchgeführten Probenahmen die Gonaden der männlichen Tiere zusätzlich zur Blutentnahme gesammelt. Anhand histologischer Schnitte sollte überprüft werden, inwiefern strukturelle Veränderungen im Gewebe (z.B.

Ovotestis) als Marker für hormonelle Wirkung verwendbar sind und ob solche Phänomene bei den beprobten Individuen nachzuweisen sind (vgl. Kap. 8).

Aufgrund ihrer strukturellen Komplexität erscheinen sowohl männliche als auch weibliche Gonaden als Lagerprobe für die UPB ungeeignet. Da zum jetzigen Zeitpunkt darüber hinaus auch keine Aussagen zu sinnvollen wirkungsorientierten Analysen an langzeitgelagerten Gonaden getroffen werden können, wurde die Eignung der Gonaden als individuelle Lagerprobe im Sinne der UPB nicht empirisch überprüft.

### **Kopfnieren**

Bei vielen adulten Süßwasserknochenfischen bildet der Pronephros die sogenannte Kopfniere. Sie ist aber nicht mehr exkretorisch tätig, sondern bildet als lymphoides Organ Erythrozyten und Lymphozyten und trägt somit wesentlich zur Blutreinigung bei. Diese Aufgabe macht die Kopfniere für wirkungsbezogene Analysen besonders interessant (O'HALLORAN et al. 1998).

Aufgrund der Schwierigkeit der reproduzierbaren Entnahme muss zum jetzigen Zeitpunkt die Kopfniere als Lagerprobe kritisch betrachtet werden. Darüber hinaus erschwert der hohe Blutanteil die Vermeidung einer Hämolyse bei der Probenbehandlung. Der Tatsache, dass die Kopfniere hinsichtlich ihrer Eignung für immunologische Untersuchungen mit Milz und Blutproben gleichzusetzen ist (KLEIN 2003), stehen somit zur Zeit noch rein praktische Gründe für den Einsatz als Lagerprobe entgegen.

### **Muskulatur**

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist die Muskulatur für Wirkungsuntersuchungen nur sehr eingeschränkt verwendbar. Aufgrund der vergleichsweise großen Biomasse, der somatischen Stabilität der DNA und der Eigenschaft, dass Muskelzellen nur wenige Substanzen einlagern, die die Isolierung von DNA behindern würden, eignet sich die Muskulatur insbesondere für DNA-Untersuchungen.

Zudem wird die Muskulatur in der UPB zur Zeit aufgrund ihrer guten Akkumulations-eigenschaft für fettlösliche Stoffe in Form von Homogenatproben für die stoffliche Belastung herangezogen. Da allerdings lediglich die linke Muskulatur der beprobten Fische zu einer Homogenatprobe vereinigt wird, wären für zusätzliche Untersuchungen ausreichende Mengen verfügbar. Die zusätzliche Beprobung von (rechter) Muskulatur für weiterführende Wirkungsanalysen oder zur Überprüfung der Probenqualität, stellt somit technisch keine große Schwierigkeit dar. Da im Rahmen des vorliegenden Vorhabens primär aber auf die Eignung der einzelnen Kompartimente zur Wirkungsindikation abgezielt werden sollte, wird die Muskulatur nicht weiter betrachtet.

### **3 Untersuchungen zur Probenahme und Probenbearbeitung von Blutplasma als Einzelprobe**

Im Rahmen dieser Teilaufgabe wurden Voruntersuchungen durchgeführt, die die Grundlage für die Erstellung einer *standard operating procedure* (SOP) für Brassenblut darstellen. In diesen Voruntersuchungen wurde die methodische Vorgehensweise von der Betäubung des Fisches bis zur Einlagerung geeigneter Blutproben überprüft und optimiert.

#### **3.1 Grundlagen**

Zum Zweck der Voruntersuchungen wurden am 05.-06.06.2002 an der UPB-Probenahme­fläche Rehlingen insgesamt 15 Brassen mit der Angel gefangen. Hierbei handelte es sich um 5 Männchen und 10 Weibchen mit Gewichten zwischen 755-1758 g und Gesamtlängen von 38-52 cm. Die Probenahme wurde prinzipiell nach der Richtlinie der Umweltprobenbank des Bundes (KLEIN & PAULUS 1996) durchgeführt. Nach dem Fangen wurden die Brassen in belüfteten und ggf. gekühlten Fischbehältern bis zur Einzelentnahme transportiert und gehältert.

#### **3.2 Betäubung des Fisches**

Durch die Untersuchungen im Rahmen des Umweltprobenbank-Zusatzprojektes *Verknüpfung der Daten der Umweltprobenbank des Bundes mit Beobachtungsansätzen des Naturschutzes – Möglichkeiten der Auswertung und Bewertung: Teilprojekt Umweltproben zur Untersuchung von Wirkungen in Ökosystemen am Beispiel hormonell wirksamer Substanzen*; BARTEL, KLEIN & QUACK 2002) lagen bereits Kenntnisse darüber vor, dass die Betäubung des Fisches erheblichen Einfluss auf die Quantität und Qualität einer Blutprobe hat.

So kann die entsprechend der Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassen (KLEIN et al. 1996) durchzuführende Betäubung des Fisches durch Stirnschlag zu blutenden Verletzungen – insbesondere zur Beschädigung der Kiemen – führen. Dies bedeutet einen hohen Blutverlust, zudem wird durch rasches Koagulieren des Blutes in Verbindung mit dem Luftsauerstoff die Entnahme einer ausreichenden Blutmenge wesentlich behindert.

Zur Betäubung von Fischen sind aus veterinärmedizinischen Gesichtspunkten (Dr. med. vet. A. BRETZINGER, mündliche Mitteilung) mehrere Methoden anwendbar. Diese sollen in der Folge hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile kurz abgehandelt werden.

Neben der Betäubung durch Stirnschlag, das auch in der nicht-industriellen Speisefischgewinnung nach wie vor das gebräuchlichste Verfahren darstellt, haben sich in den letzten Jahren vor allem chemische Narkotika auf Basis der Etherpräparate als geeignet erwiesen. Für den Zweck der UPB spielen hierbei allerdings zwei Faktoren eine entscheidende Rolle:

- Bei den wenigsten Präparaten handelt es sich um chemische Reinsubstanzen sondern um Gemische. Inwiefern die darin enthaltenen Substanzen von dem Fisch aufgenommen und inkorporiert werden, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht bestimmt werden. Dementsprechend könnten Rückstände dieser Substanzen in den Homogenaten nachweisbar werden bzw. Konzentrationen gemessener Substanzen verändern.
- Darüber hinaus handelt es sich um nicht zugelassene Substanzen, die in Abhängigkeit von der Größe des Fisches in unterschiedlich konzentrierten Wasserbädern angesetzt werden müssten. Somit muss diese Art der Betäubung auch aus pragmatischen Gesichtspunkten abgelehnt werden.

Die ansonsten in der Fischwirtschaft ebenfalls erfolgreich angewandte Methode der Betäubung durch CO<sub>2</sub>-Begasung scheidet bei Cypriniden aus, da diese einen – bisher noch nicht näher bekannten – Abwehrmechanismus entwickelt haben (BRETZINGER, mündl. Mitteilung).

Ein weiteres in der industriellen Speisefischgewinnung gebräuchliches Verfahren ist die Methode der elektrischen Durchströmung. Hierbei handelt es sich um ein leicht durchführbares Verfahren, bei dem mittels 50V-Niederspannungsgeräten die elektrische Spannung in einem Wasserbad fließend erhöht wird. Die Anwendung von Gleichstrom stellt die vergleichsweise schonendste Betäubungsart dar. Innere Blutungen können weitestgehend ausgeschlossen werden.

Gemäß der hier erläuterten Vorgaben wurde nach Absprache mit dem o.g. Experten die Methode der elektrischen Durchströmung als die zur Erreichung der o.g. Ziele am geeignetsten ausgewählt.

Mit Hilfe des zur Betäubung der Fische verwendeten Gerätes BE 300 (Firma Grassl, Schönau) werden die Fische in zwei Schritten betäubt: In der Vorbetäubungsphase wird die Spannung an den Elektroden im Behälter von 0 auf 160 Volt erhöht. Hierbei wird reiner Gleichstrom verwendet, der lediglich gegen Ende dieser Phase in pulsierender Gleichstrom umgesetzt wird. In der sich anschließenden Hauptbetäubungsphase wird die Endspannung entsprechend den Vorgaben der Zeitregler gehalten. Neben der Tatsache, dass innere Blutungen weitestgehend ausgeschlossen werden können, tritt durch dieses Verfahren auch

tatsächlich lediglich eine Betäubung des Fisches ein, d.h. ein Herzstillstand kann vermieden werden. Dies ist insbesondere in dem Zusammenhang mit der Blutentnahme wichtig, weil durch den noch aktiven Blutkreislauf zusätzlich Blut in die Kanüle gepumpt wird.

Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die exakte Einstellung des Gerätes von folgenden Faktoren abhängig ist:

- In Abhängigkeit von der Größe des Fisches variiert die Strom-Leitfähigkeit in der Box. Je größer der Fisch, desto höher ist die Stromstärke. Dementsprechend muss die Betäubung sanfter erfolgen, d.h. in diesem Fall muss die Umstellung auf pulsierenden Gleichstrom später erfolgen.
- Darüber hinaus ist die Betäubungsleistung auch abhängig von der Wasserleitfähigkeit. Da als Medium ausschließlich Habitatwasser verwendet wird, sind Unterschiede in der Leitfähigkeit möglich, die durch Veränderung der Geräteparameter (z.B. Zeitpunkt des Umstellens auf pulsierenden Gleichstrom, Dauer der Phasen) unter Umständen spezifisch angepasst werden müssen.

### **3.3 Blutentnahme**

Um zum Zwecke von Wirkungsanalysen Blut zu gewinnen, empfiehlt sich die Verwendung von Blut, das direkt dem Blutkreislauf entnommen wird. Die richtliniengemäße Öffnung der Bauchhöhle führt zu hohen Blutverlusten. Das nach Kontakt mit Laborluft unmittelbar koagulierende Vollblut verhindert außerdem durch Verstopfung der handelsüblichen Kanülen eine fehlerfreie Blutentnahme. So konnte bereits im Vorläuferprojekt empirisch ermittelt werden, dass durch einen durch den Kiemenraum geführten Herzstich äußere und innere Verletzungen minimiert werden können. Darüber hinaus können durch diese Methode ausreichende Mengen von Vollblut garantiert werden. Zur Blutentnahme sind v.a. aus dem medizinischen Bereich mittlerweile zahlreiche Systeme etabliert, die sich durch ein geschlossenes Blutentnahmesystem auszeichnen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass das Vollblut mittels einer feinen Metallkanüle in ein durch eine Membran verschlossenes Probengefäß (i.d.F. Monovette) überführt wird. In diesem Zusammenhang musste deswegen lediglich geklärt werden, welche Kombination von Kapillare und Monovette für die Anwendung zur Blutentnahme beim Brassen am geeignetsten ist.

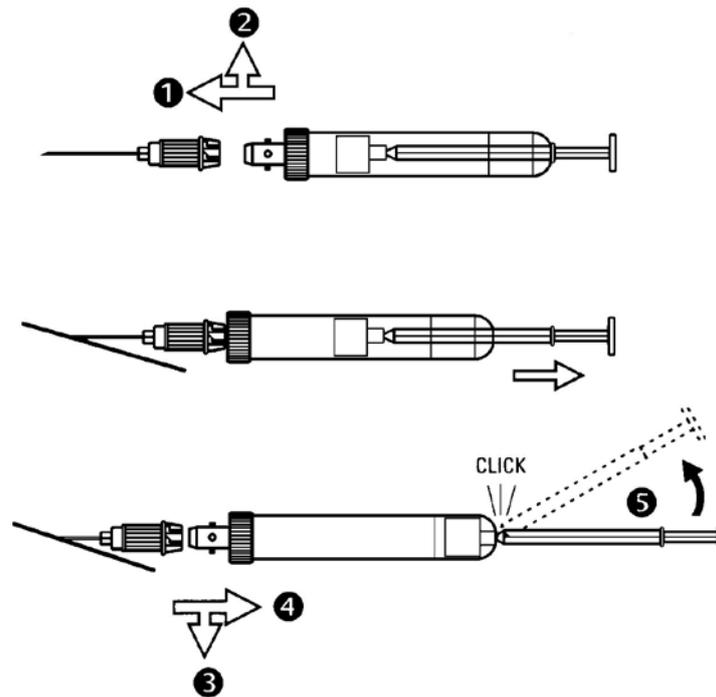


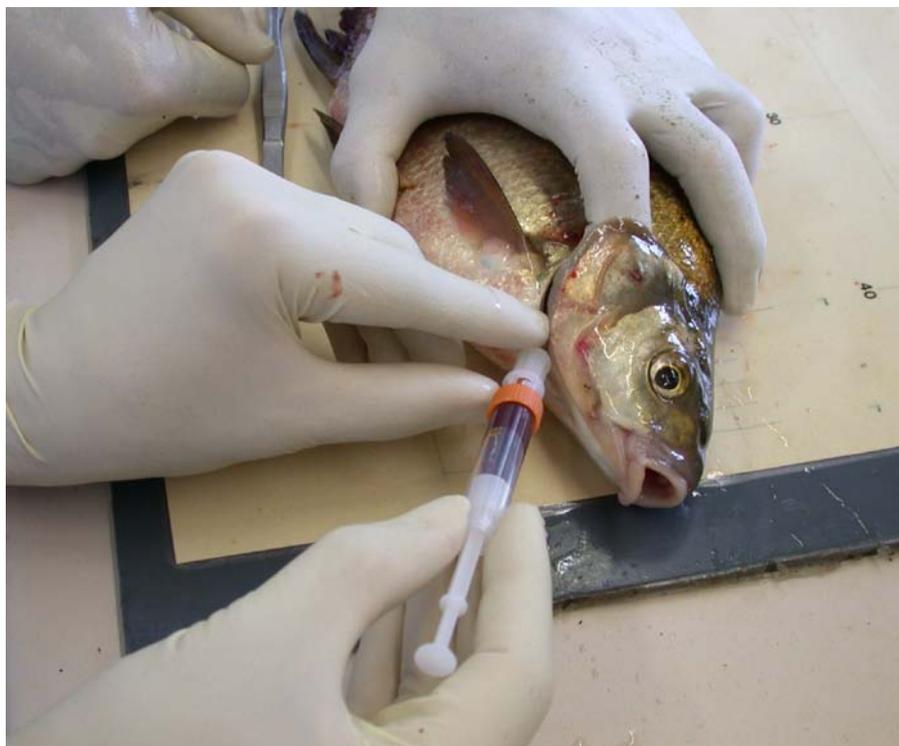
Abb. 1: Prinzip des geschlossenen Blutentnahmesystems mittels S-Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht)

Es konnte festgestellt werden, dass durch die Verwendung einer möglichst großen Kanüle ( $\varnothing = 0,9 \text{ mm}$ ) die Zerstörung von Leuko- und Erythrozyten durch Scherkräfte an der Kanülenspitze weitestgehend vermieden werden kann. Mit nur unwesentlich dünneren Kanülen ( $\varnothing = 0,8 \text{ mm}$ ) erfolgte aufgrund ausgeprägterer Scherkräfte häufiger eine Zerstörung der Blutzellen, die zu einer deutlichen Verfärbung der nach Zentrifugation erhaltenen Plasmen führten.



Abb. 2: Anatomie des Brassen - Die Lage des Herzens ist mit dem Pfeil gekennzeichnet

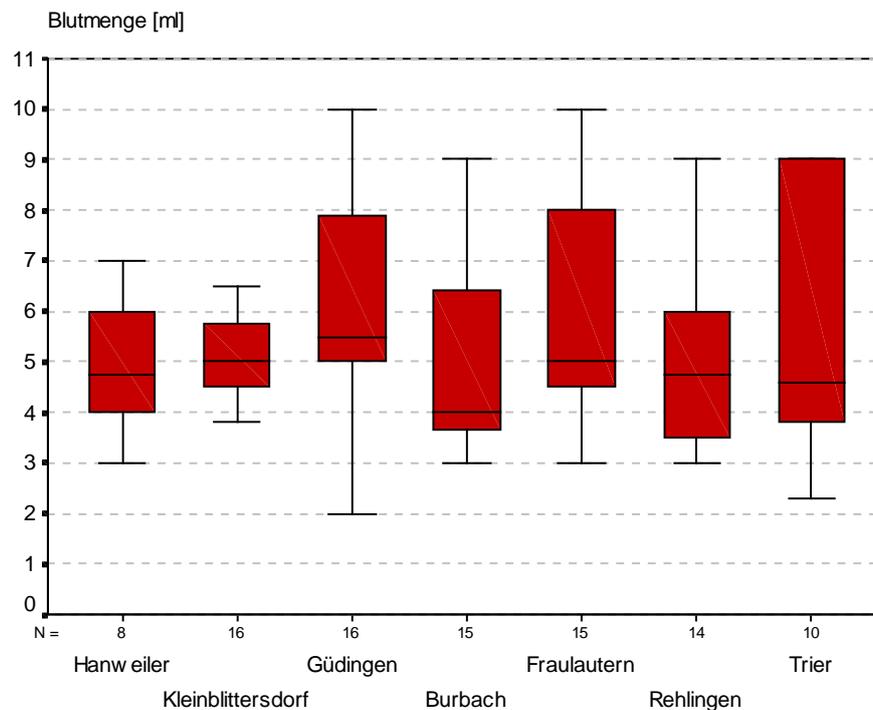
Darüber hinaus kann bei der Blutentnahme unter Umständen zusätzlich die im Kiemenbereich befindliche Labor- bzw. Raumluft aufgenommen werden. Durch Eintritt von Luft in die Monovette während der Probenahme wirken Reibungskräfte, die zur Zerstörung von Leuko- und Erythrozyten führen. Die dadurch bedingte Beeinträchtigung der Probe kann minimiert werden, wenn mehrere, möglichst kleinvolumige Probengefäße nacheinander an die in das Herz reichende Kanüle angeschlossen werden. Der Austausch der Monovetten ist durch das System der 3-Nocken-Arretierung der S-Monovetten® problemlos möglich. Die Auswahl der am wenigsten beeinflussten Proben kann nach Zentrifugation und optischer Begutachtung der Plasmen erfolgen.



**Abb. 3: Blutentnahme mittels Herzstich durch die Kiemenwand**

Für Wirkungsanalysen sind aufgrund der heutigen Analysemethoden meist minimale Mengen ausreichend. Mit Hilfe der hier definierten Methode ist es ohne Probleme möglich, auch mehr als die minimal zu fordernden 2 ml Vollblut zu extrahieren. Im Rahmen des Vorläuferprojektes „Umweltproben zur Untersuchung von Wirkungen in Ökosystemen am Beispiel hormonell wirksamer Substanzen“ (BARTEL et al. 2002) wurde mit dieser Methode bereits an 94 Brassens, die nach der Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassens (KLEIN et al. 1996) gewonnen wurden und deshalb vergleichbare Größen aufwiesen, Vollblutproben gewonnen. In Abb. 4 sind die gewonnenen Blutmengen dargestellt. Es wird deutlich, dass in allen Fällen ausreichende und in den meisten Fällen

weit darüber hinaus gehende Blutmengen gewonnen werden konnten. Bei den im Rahmen dieser Untersuchung beprobten Brassens konnten mit Hilfe dieser Methode durchschnittlich 10 ml und maximal bis zu 22 ml Vollblut (weibliches Tier, Körpergewicht 1231 g) gewonnen werden.



**Abb. 4: Blutmenge pro Individuum der in der Saar und Mosel untersuchten männlichen Brassens (Median, Perzentile nach SPSS) (aus BARTEL et al. 2002)**

Entsprechend den oben beschriebenen Erfahrungen wurden folgenden Materialien für die Blutentnahme als geeignet ausgewählt und für die Probenahme verwendet:

- S-Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht; 2,6 ml,  $\varnothing = 13$  mm, 65 mm Länge; Bestell-Nr. 04.1906.001 bzw. 04.1907.001)
- Kanüle (Sarstedt, Nümbrecht; steril, einzeln verpackt,  $\varnothing = 0,9$  mm, 38 mm Länge; Bestell-Nr. 85.1160)

### 3.4 Kompartimentauswahl

Vollblut besteht zu etwa 55% aus eiweißreichem Plasma und zu etwa 44% aus Erythrozyten. Leukozyten und Thrombozyten machen weniger als 1% aus. Die Aufgabe des Bluts ist die Konstanthaltung des inneren Milieus: Neben Sauerstoff werden auch Glucose, Aminosäuren und Fettsäuren transportiert. Natrium, Kalium und andere Salze regulieren die Flüssigkeitsmenge und den pH-Wert. Auch Zellen und Stoffe des Abwehrsystems sowie Substanzen, die für die Blutstillung nötig sind, finden sich im Blut. Hormone, chemische Botenstoffe, und Abfallprodukte, wie z.B. Kohlendioxid, werden über den Blutweg zu und von den Zellen transportiert.

Die Bedeutung der einzelnen Kompartimente für Fragen der Wirkungsindikation sind allerdings sehr unterschiedlich. Die festen Bestandteile des Blutes, die Blutzellen (Erythro-, Leuko- und Thrombozyten), sind kerntragende Körperzellen, die beispielsweise zur Untersuchung genotoxischer Wirkungen, wie zum Beispiel dem Nachweis von Mikrokernen, geeignet sind. Beispielhaft genannt werden kann hier die Bestimmung genotoxischer Wirkungen anhand von DNA-Strangbrüchen in Erythrozyten (sog. Comet-Assay) (vgl. KAMMANN 1997, hier auch: ANDERSON et al. 1994, KAMMANN 1998, COTELLE & FÉRARD 1999, GLOS et al. 2000, NEHLS & SEGNER 2001, FLAMMARION et al. 2002). Für die Zwecke der Umweltprobenbank, der Einlagerung und retrospektiven Analyse, erscheinen sie allerdings hinsichtlich der Probenbearbeitung und Lagerfähigkeit problematisch. Die Methoden zur Lagerung von Blutzellen in der Transfusionsmedizin bzw. in Blutbanken beschränken sich auf die Lagerung von Erythrozyten für maximal sechs Wochen bzw. von Thrombozyten und Leukozyten für maximal fünf Tage. Erythrozyten werden hierbei zur Vermeidung von Thromben in einem schüttelfreiem Kühlschranks bei 4°C gelagert. Im Gegensatz dazu müssen Thrombozyten und Leukozyten in Gasaustauschbeutel auf Schüttelwaagen gelagert werden. Alle Blutzellen sind hierbei aus ihrem eigentlichen Medium extrahiert und befinden sich in speziellen Lösungen. Aufgrund der Problematik der Zerstörung der Zellen durch Eiskristallbildung werden die Proben nicht eingefroren. Der Auftauprozess würde zu einer Hämolyse, zum Freisetzen von Hämoglobin, führen, was die Probe nachhaltig beeinträchtigt (sog. hämolytische Probe).

Das Blutplasma macht mengenmäßig den größten Teil des Blutes aus und ist als flüssiger Bestandteil des Blutes für den Transport zahlreicher Komponenten, wie Fette, Hormone und Eiweiße, verantwortlich. Als Inhaltsstoffe besonders erwähnenswert sind das mengenmäßig wichtigste Plasmaeiweiß Albumin, die Lipoproteine und die Immunglobuline, die zusammen mit den weißen Blutkörperchen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielen. Beim Blutplasma handelt es sich um den technisch am einfachsten handhabbaren Bestandteil des Blutes. Es wird in der Medizin für zahlreiche Analysen verwendet: Prinzipiell ist tiefgefrorenes

Plasma – genauso wie Serum – für alle immunologischen sowie hormonellen Untersuchungen geeignet. Zudem kann das Plasma vergleichsweise einfach über Zentrifugation aus Vollblut gewonnen werden. Da es zu etwa 91% aus Wasser besteht ist das Plasma auch hinsichtlich der Einlagerung in die Kühlsysteme der UPB unproblematisch. In den o.g. medizinischen Blutbanken erfolgt die Lagerung von Plasma aus Kapazitätsgründen bei -40°C. Aufgrund der Gefahr des Protein- und Enzymabbaus bzw. der Verkeimung und eines möglichen negativen RNase-Einflusses erfolgt die Lagerung menschlicher Blutplasmen für maximal ein Jahr.

Blutserum wurde in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt, da es sich von Blutplasma lediglich durch die Tatsache unterscheidet, dass ihm durch Koagulation Fibrin entzogen wurde, technisch allerdings schwieriger zu gewinnen ist. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass in Abhängigkeit vom bisher ungeklärten Sedimentationsverhalten von Fisch-Erythrozyten die Menge der Probe deutlich eingeschränkt sein kann und deswegen die Methode nicht sicher standardisierbar ist.

Aus diesen Gründen wurde das Blutplasma als für Wirkungsuntersuchungen an Brassern geeignetes Zielkompartiment ausgewählt. Die Auswahl von Blutplasma als Probe erfolgte u.a. auch aufgrund der umfangreichen Erfahrungen und Einsatzmöglichkeiten von Plasma aus dem humanmedizinischen Bereich der Umweltprobenbank (vgl. Verfahrensrichtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Vollblut bzw. Blutplasma, ECKARD & MÜLLER 1996). Die Gewinnung von Blutplasma erfolgt nach der üblichen Methode mittels 10-minütiger Zentrifugation mit 3000 U/min bei 2°C.

### **3.5 Zusatzstoffe**

Aufgrund der Eigenschaft des Blutes in Verbindung mit Luftsauerstoff rasch zu koagulieren, musste im Rahmen dieser Untersuchungen geprüft werden, ob und welche Zusatzstoffe für die Einlagerung zugesetzt werden müssen, um eine veränderungsfrei lagerfähige Probe zu gewährleisten. Des Weiteren wurde in diesem Zusammenhang geprüft, inwiefern auf für bestimmte Fragstellungen notwendige und übliche Zusatzstoffe, wie beispielsweise Proteinasehemmer, durch die direkte Einlagerung über LIN verzichtet werden kann. Grundlegende Prämisse hierbei war, dass weitestgehend auf die Verwendung von Zusatzstoffen verzichtet werden sollte, um im Sinne der UPB eine möglichst veränderungsfreie und qualitativ hochwertige Probe zu erhalten.

### 3.5.1 Antikoagulanzen

Der Zusatz von Blutgerinnungshemmern ist unabdingbar, da das Vollblut unmittelbar nach Kontakt mit der Labor- bzw. Raumluft koaguliert und koaguliertes Blut für weitere Analysen nicht mehr verwendbar ist.

Prinzipiell stehen mehrere Substanzen zur Verfügung, die Blutproben (zur Gewinnung von Blutplasma bzw. zur Untersuchung der Blutzellen) oder Blutkonserven ungerinnbar machen. Hierbei unterscheidet man Substanzen aus der Gruppe der Heparinoide oder Substanzen, die Calcium-Ionen binden, wie Citrat, EDTA, Fluoride und Oxalat.

In der Transfusionsmedizin werden Blutproben meist mit Citrat als Gerinnungshemmer versetzt. Dieses wird, nachdem das Blut dem Empfänger übertragen wurde, im Gegensatz zu den anderen Substanzen im Körper wieder abgebaut. In der labortechnischen Anwendung wird allerdings häufiger EDTA (Ethylene Diamine Tetra-Acetate, Ethylen-diamintetraessigsäure) als Gerinnungshemmer eingesetzt. Da zur Verflüssigung des Blutes aber vergleichsweise große Mengen an EDTA eingesetzt werden müssen, tritt bei geringen Blutmengen ein zu großer Verdünnungseffekt ein. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund, dass für Wirkungsanalysen minimale Probenmengen ausreichend sind, als unangebracht.

In den letzten Jahren hat sich in der klinischen Analytik zunehmend Heparin als Antikoagulanzen durchgesetzt. Es handelt sich um ein sulfatgruppenhaltiges, wasserlösliches, rechtsdrehendes Glykosaminoglykan aus Glucosamin- u. Glucuronsäure- bzw. Iduronsäureresten (Molekulargewicht ca. 16000 g/mol), das als Polyanion mit basischen Polypeptiden bzw. Proteinen Komplexe bildet (vgl. Abb. 5). Im Blutplasma bindet Heparin an Antithrombin III und macht aus diesem sog. Progressivinhibitor einen „Sofortinhibitor-Komplex“, der auf die Blutgerinnung wirksam wird. Es ist in handelsüblichen S-Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht) in zwei verschiedenen Präparierungen (10-30 I.E./ ml Vollblut) enthalten (Heparin-Gel und Heparin in Kugelform). Das Heparin ist hierbei auf Kunststoffgranulat aufgebracht, welches aufgrund seiner Dichte beim Zentrifugieren eine Trennschicht zwischen Plasma und korpuskulären Bestandteilen bildet. Aus Heparinplasma können nach Angaben der Hersteller fast alle klinisch-chemischen Parameter bestimmt werden.

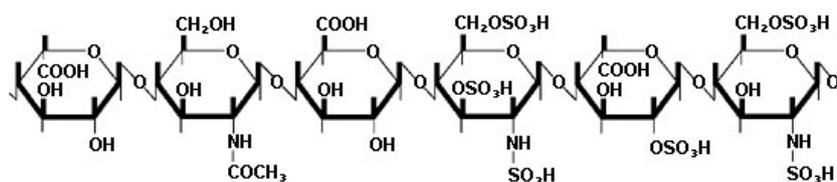
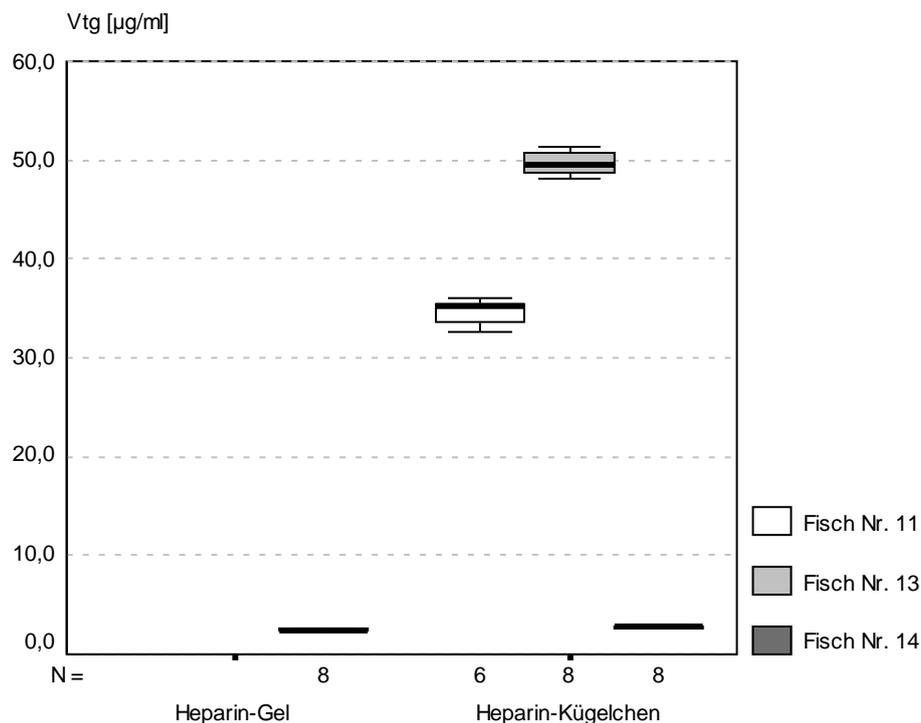


Abb. 5: Strukturformel von Heparin

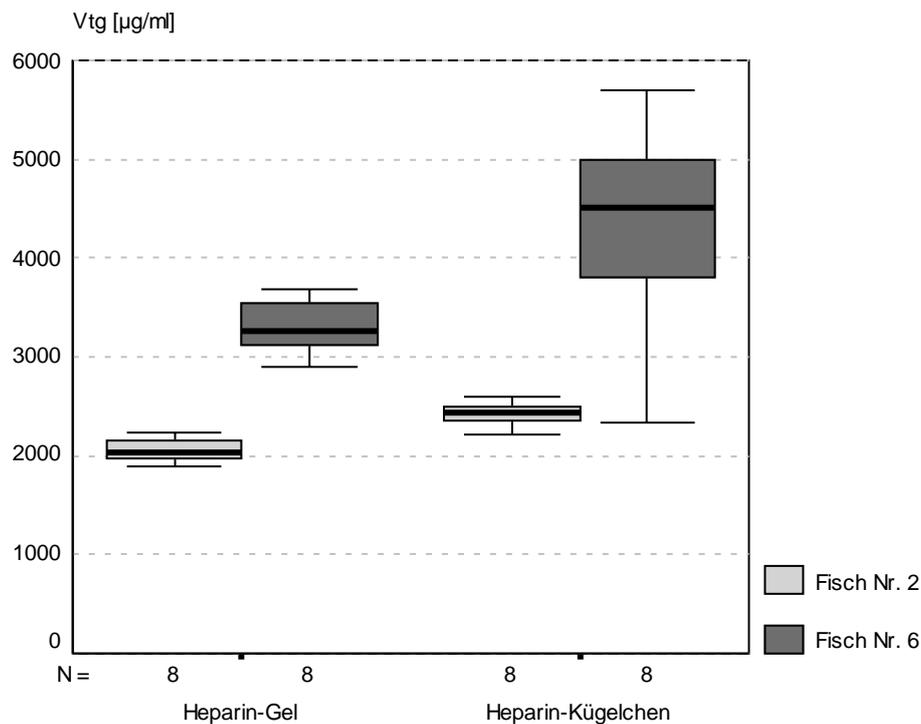
Die zwei beschriebenen Formulierungen, Lithium-Heparin-Gel und Lithium-Heparin-Kügelchen, werden vom Hersteller als je nach Fragestellung unterschiedlich geeignet eingestuft. Zur Überprüfung der Eignung der beiden Formen wurden deshalb an drei männlichen und zwei weiblichen Fischen Vtg-Analysen mittels ELISA durchgeführt, mit deren Hilfe dargestellt werden sollte, ob die Wahl der Heparinform einen Einfluss auf die Vtg-Konzentration im untersuchten Individuum hat. Dazu wurde entsprechend der zuvor beschriebenen Methode aus frisch geangelten Brassens Blutplasma gewonnen und in jeweils sechs bis acht Aliquoten Vtg nach der in Kap. 7.2 beschriebenen Methode analysiert.

Bei der Betrachtung der Vtg-Konzentrationen der männlichen Proben kann kein Einfluss der Darreichungsform untersucht werden, da nur an einem Männchen beide Verfahren getestet werden konnten (vgl. Abb. 6). Bei den Weibchen, deren Vtg-Konzentration deutlich höher ist, sind von vorneherein größere Schwankungen zwischen Parallelbeprobungen zu erwarten. Mit der Technik der Heparin-Kügelchen wurden höhere Konzentrationen erhalten (vgl. Abb. 7), was aber aufgrund der Stichprobengröße und des semiquantitativen Charakters des ELISA nicht überbewertet werden sollte.



**Abb. 6:** Abhängigkeit der mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration von der Heparin-Darreichungsform in männlichen Brassens

Die gewonnenen Ergebnisse lassen somit keine Rückschlüsse auf eine bessere Eignung einer bestimmten Formulierung zu. Da die Monovetten mit Lithium-Heparin-Kügelchen (Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr. 04.1906.001) aufgrund eines leicht anderen Zentrifugationsverhaltens einfacher handhabbar sind, was das fehlerfreie Abpipettieren der Blutplasmen nach Zentrifugation erleichtert, wird ihre Verwendung empfohlen



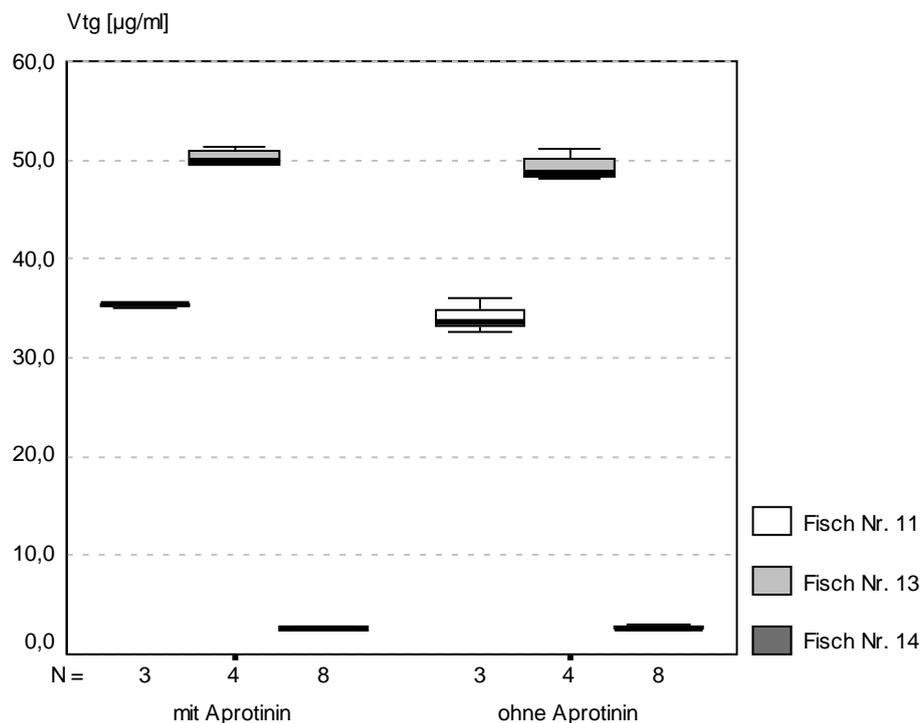
**Abb. 7:** Abhängigkeit der mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration von der Heparin-Darreichungsform in weiblichen Brassen

### 3.5.2 Proteinaseinhibitor

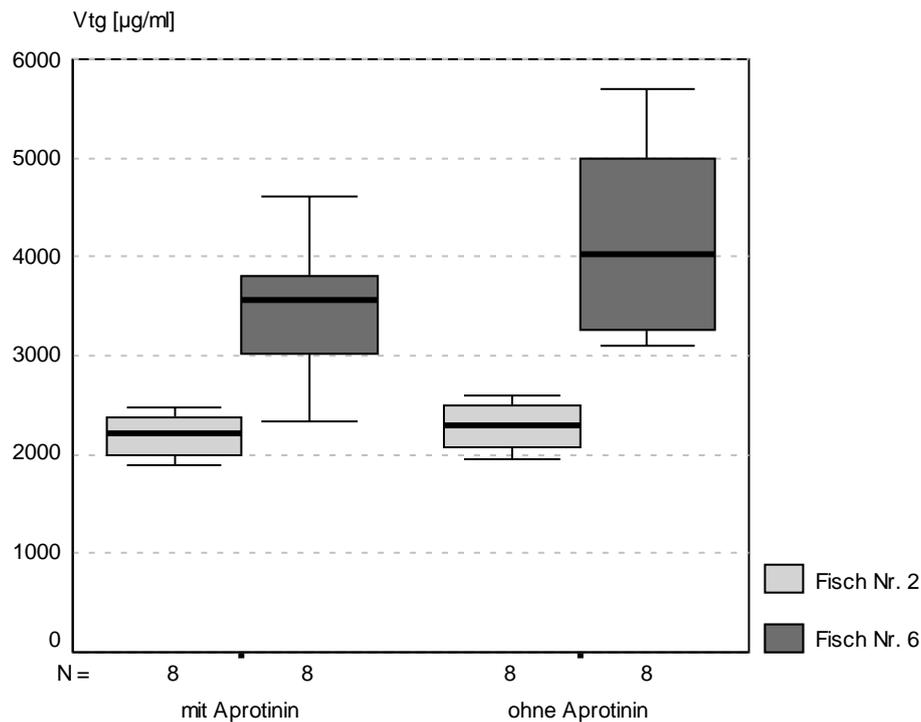
In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, inwiefern auf üblicherweise verwendete spezielle Zusatzstoffe zur Hemmung des Proteinabbaus verzichtet werden kann, wenn die frisch gewonnenen Proben unmittelbar nach der Aufarbeitung über LIN eingelagert werden. Dies wurde ebenfalls am Beispiel der Leitsubstanz Vitellogenin durchgeführt. Bei Vtg-Analysen in Blutproben wird üblicherweise Aprotinin, ein aus 58 Polypeptiden zusammengesetzter Proteinasehemmer, als Zusatzstoff zugesetzt. Es zählt zu den eiweißspaltenden Enzymen (proteolytische Hydrolasen, Endopeptidasen i.e.S.), die nach ihrem Wirkungsmechanismus unterschieden werden.

Von den o.g. drei männlichen und zwei weiblichen Brassen wurden jeweils zwei weitere Vollblutproben gewonnen, von denen jeweils eine mit 1mg/ml Aprotinin (SIGMA, Steinheim; 4 TIU/mg) versetzt wurde. Die Proben wurden nach 1-stündiger Lagerung bei 4°C zentrifugiert (3000 U/min, 2°C), die Plasmen abpipettiert und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Die Proben wurden bis zum Assay (vgl. Kap. 7.3) über LIN gelagert.

Bei den drei untersuchten Männchen konnte keine Unterschiede in der Vtg-Konzentration mit oder ohne Aprotinin nachgewiesen werden (vgl. Abb. 8). Bei den Weibchen ergab die Anwendung des Verfahrens ohne Aprotinin sogar leicht höhere Werte, die aber aufgrund des semiquantitativen Charakters des ELISA nicht überbewertet werden dürfen (vgl. Abb. 9). Nach diesen Ergebnissen muss geschlossen werden, dass kein Effekt nachzuweisen ist und somit während der Laborarbeiten kein Abbau von Vtg stattgefunden haben kann. Da bei der Probenahme LIN mitgeführt wird und deshalb die Bearbeitungszeiträume bis zur Tiefkühlung der Proben nicht länger sind als in diesem Laborversuch, ist bei der Probenahme ebenfalls nicht von einem Proteinabbau auszugehen. Aus diesem Grund wird auf den Zusatz von Aprotinin und anderer Proteinaseinhibitoren verzichtet.



**Abb. 8:** Abhängigkeit der mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration vom Zusatz von Aprotinin im Blut männlicher Brassen



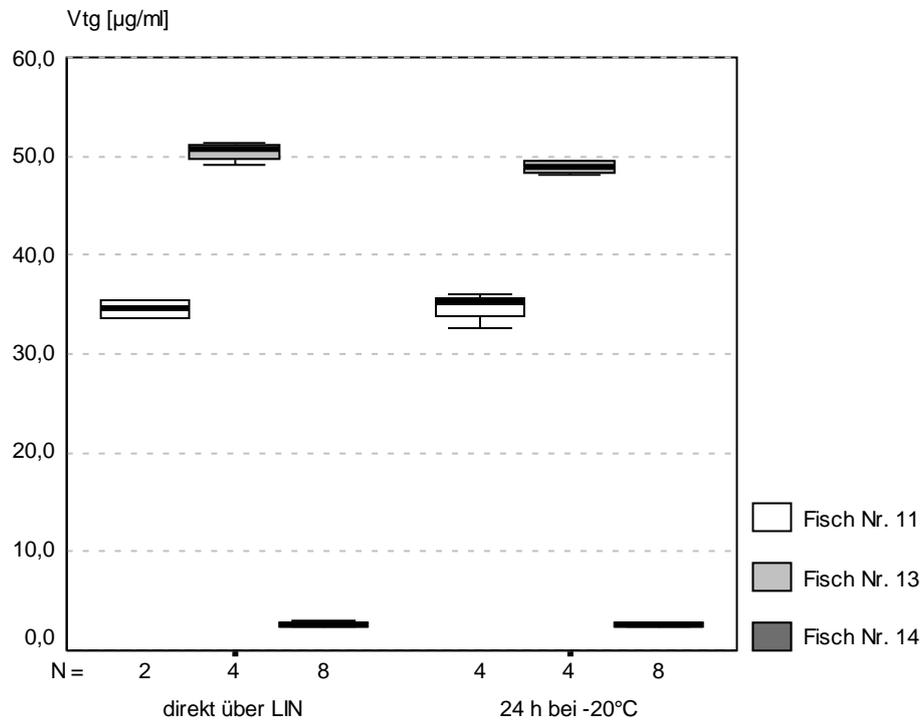
**Abb. 9:** Abhängigkeit der mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration vom Zusatz von Aprotinin im Blut weiblicher Brassen

### 3.6 Probenbehandlung und -lagerung

Die Lagerung von Blutplasma ist aufgrund des hohen Wasseranteils prinzipiell unproblematisch. Im Gegensatz zu Vollblutproben bedarf es hierbei keiner aufwändigen Apparatur, sondern die Proben können zur veränderungsfreien Lagerung ohne weitere Schwierigkeiten über LIN überführt werden.

Zur Absicherung dieser Annahme wurden an den bereits beschriebenen drei männlichen und zwei weiblichen Brassen der Einfluss der Einfriertechnik auf die Vtg-Konzentration im Blutplasma überprüft. Hierbei wurden die Vtg-Gehalte von direkt über LIN eingefrorenen Plasmen mit solchen verglichen, die über 24 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgefroren wurden, ehe sie über LIN überführt wurden. Bei dieser Vorgehensweise handelt es sich um ein übliches Verfahren zum schonenden Tieffrieren von Zellen, Zellkulturen und Geweben (vgl. z.B. HENGSTLER et al. 2000a, HENGSTLER et al. 2000b). Es konnte in beiden Fällen kein Einfluss der Einfriertechnik auf die Vtg-Konzentrationen der Plasmen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10 und Abb. 11). Das von HENGSTLER et al. (2000) beschriebene Verfahren, nachdem die Proben zuerst für 1-24 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingelagert wurden und dann über LIN überführt wurden, erbrachte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur direkten Einlagerung in

der LIN-Gasphase. Da bei der Probenahme LIN zur Verfügung steht, wird die bewährte Methode des direkten Tiefrierens über LIN präferiert und empfohlen.



**Abb. 10:** Einfluss der Einfriertechnik auf die mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration im Blut männlicher Brassens

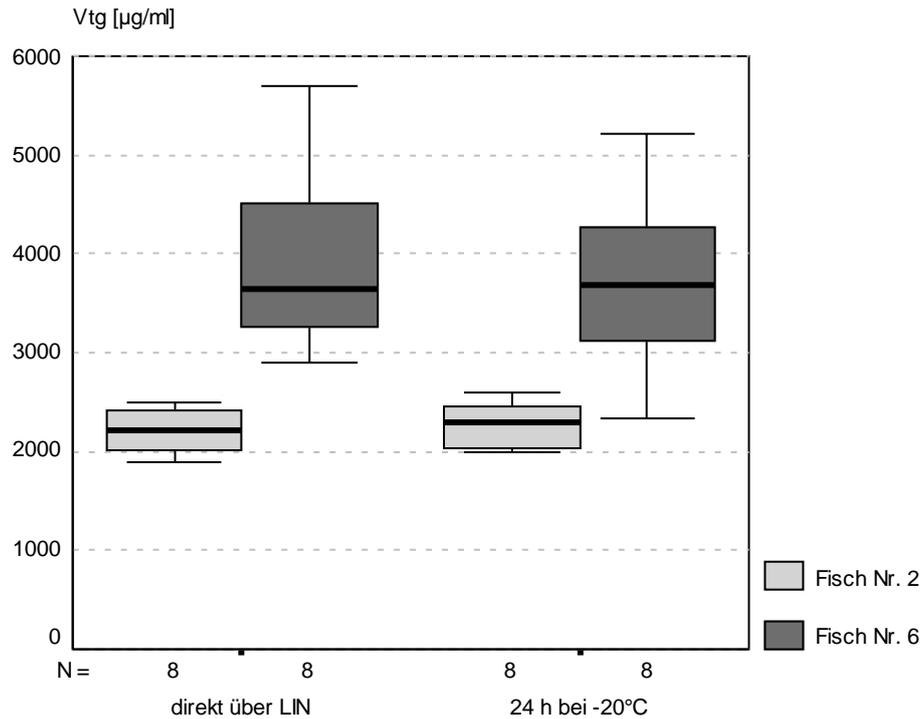


Abb. 11: Einfluss der Einfriertechnik auf die mittels ELISA gemessenen Vtg-Konzentration im Blut weiblicher Brassen

## 4 Untersuchungen zur Probenahme und Probenbearbeitung Milz als Einzelprobe

### 4.1 Grundlagen

Wie in Kap. 2 dargestellt, wurde die Milz als Vertreter der Gewebe ausgewählt. Ziel der eingelagerten Milzproben soll sein, zum einen eine strukturell einwandfreie Gewebeprobe, zum anderen aber auch eine Probe zu erhalten, in der nach dem Auftauen Enzymaktivitäten oder sonstige Parameter (z.B. Phagozytose-Aktivität von Blutzellen) nachweisbar sind.

Diese Zielsetzung erfordert ein besonderes Handling der Probe, das in der Folge beschrieben wird. Auf die Durchführung praktischer Untersuchungen hierzu konnte aufgrund umfassender Voruntersuchungen aus dem humanmedizinischen Bereich verzichtet werden. Die methodische Vorgehensweise zur kryotechnischen Einlagerung von Zellen, Zellkulturen

und Gewebekulturen ist umfassend veröffentlicht (DI MAIO & SHILLITO 1989, MASTERS 2000, SHORE & RADWAY 2000, LINDL 2002).

## 4.2 Entnahme der Milz

Zur Entnahme der Milz mussten keine eigenen Untersuchungen durchgeführt werden, da die richtliniengemäße Sektion des Fisches die Milz bereits beinhaltet. Aufgrund der methodischen Vorgehensweise unter Clean-Bench-Bedingungen erfüllt die nach dieser Methode gewonnene Probe auch alle Anforderungen für weiterführende wirkungsbasierte Untersuchungen.

Die Entnahme der Milz erfolgt entsprechend der Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassen (KLEIN et al. 1996) durch Sektion. Nach dem richtliniengemäßen Wiegen der Milzprobe wird sie, wie in Kap. 4.3 beschrieben, weiter behandelt.

## 4.3 Probenbehandlung und -lagerung

Die Weiterbearbeitung und Einlagerung der Milzprobe soll unter der Prämisse erfolgen, dass nach Einfrieren und erneutem Auftauen der Probe ein Erhalt des Zellgewebes und mögliche enzymatischen Aktivitäten weiterhin gegeben sind. Dies stellt aber einen sehr sensiblen Bereich dar, da beispielsweise die membrangebundenen Enzyme leicht durch die Dauer und Art der Lagerung inaktiviert werden können. Das zerstörungsfreie Einfrieren und Auftauen erfordert deswegen ein bestimmtes Handling, ein bestimmtes Timing, Zusatzstoffe und ein speziell definiertes Nährmedium. Da zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht definiert sein kann ist, welche (Wirkungs-)Untersuchungen mit den Milzproben erfolgen sollen, müssen die Proben nach einem allgemeingültigen Schema behandelt werden, das aus mehreren geeigneten Verfahren ausgewählt wurde und in der Folge beschrieben wird.

Die Milzproben wurden im Anschluss an die Sektion entsprechend den Vorgaben zur Gewinnung von Gewebe- und Zellproben nach SHORE & RADWAY (2000) in PBS-Puffer gewaschen, um Blutreste zu entfernen. Hierbei handelte es sich um D-PBS, Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung (1x) flüssig (GIBCO, Karlsruhe; Best.-Nr. 14190-094), ohne Calcium, ohne Magnesium, und ohne Natriumbicarbonat. Die in Tab. 2 angegebenen Formulierungen entsprechen denjenigen, die in der Literatur aufgeführt sind. Einzelne Bestandteile können jedoch in den produzierten Chargen je nach Verfügbarkeit der

verschiedenen Rohstoffe durch die hydrathaltigen oder wasserfreien Formen und durch die freien Basen oder Hydrochloridformen substituiert werden.

**Tab. 2: Formulierung von Dulbecco's Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (GIBCO, Karlsruhe)**

Anorganische Salze	g/l
CaCl <sub>2</sub> (anhydr.)	-
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	-
KCl	0,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
MgCl <sub>2</sub> (anhydr.)	-
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	-
NaCl	8,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	-
D-Glucose	-
Sodiumpyruvat	-

Nach Reinigung des Gewebes wurde die Probe in eine Lagerlösung überführt, die mehrere Eigenschaften vereint. Sie schützt zum einen vor Kristallbildung und ermöglicht somit den Erhalt der Gewebestruktur. Zum anderen ermöglicht das darin enthaltene Nährmedium auch nach dem Auftauen den Erhalt enzymatischer Aktivitäten.

Diese Kulturmedien werden in der Zellbiologie vielfach eingesetzt und sind bestens etabliert. Die hier verwendete Lösung richtet sich nach den Vorgaben von SHORE & RADWAY (2000). Dementsprechend wurde die Lagerlösung in Form einer 10%igen DMSO-Lösung wie folgt zusammengesetzt:

- Dimethylsulfoxid (DMSO) (ROTH, Karlsruhe; Best.-Nr. 4720.1), Rotipuran® ≥99,5%, p.a. DMSO verhindert als Schutzsubstanz die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydration des Cytoplasmas, indem es das Zellwasser ersetzt und bindet.
- Fötale Rinderserum (EG zugelassen, Südamerika), (GIBCO, Karlsruhe; Best.-Nr. 10270-106); vom Hersteller auf Viren und Mycoplasmen getestet. Die Gewinnung des Vollbluts erfolgt durch Herzpunktion der Föten. Nach Gerinnung werden die Seren durch Zentrifugation vom Blutkuchen abgetrennt, vereinigt, durch einen 0,1 µm Sterilfilter filtriert und tiefgefroren. Alle weiterverarbeitenden Schritte werden in Räumen mit HEPA-gelilterter unter Überdruck stehender Luft (Laminarluftstrom-Kabinette der Klasse 100) durchgeführt (evtl. Qualitätskontrolle und Mikrobiologische Tests bzw. Virustests). Das Serum liefert u.a. Bindungsproteine und zahlreiche zur Synthese benötigten Amino-

säuren, anorganische Salze und Spurenelemente sowie Puffer- und Neutralisationssysteme (LINDL 2002).

- klassisches Zellkulturmedium RPMI 1640 Medium (1x) flüssig (mit L-Glutamin) (GIBCO, Karlsruhe; Best.-Nr. 21875-034). Die in Tab. 3 aufgeführten Formulierungen sind typisch und entsprechen den Literaturangaben (vgl. MOORE et al. 1967). Je nach Verfügbarkeit der Ausgangsmaterialien können jedoch in den produzierten Chargen die hydrierten gegen die wasserfreien Salze sowie die freien Basen gegen ihre Salze ausgetauscht werden.

**Tab. 3: Formulierung des RPMI 1640 Mediums (GIBCO, Karlsruhe)**

<b>Anorganische Salze</b>	<b>mg/l</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>mg/l</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	100,00	L-Arginin*HCl	240,00
KCl	400,00	L-Asparagin (freie Base)	50,00
MgSO <sub>4</sub> (anhyd.)	--	L-Asparaginsäure	20,00
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	100,00	L-Cystin	50,00
NaCl	6000,00	L-Cystin*2HCl	--
NaHCO <sub>3</sub>	2000,00	L-Glutaminsäure	20,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhyd.)	800,00	L-Glutamin	300,00
<b>andere Komponenten</b>	<b>mg/l</b>	Glycin	10,00
D-Glukose	2000,00	L-Histidin (freie Base)	15,00
Glutathion (reduziert)	1,00	L-Hydroxyprolin	20,00
HEPES	--	L-Isoleucin	50,00
Phenolrot	5,00	L-Leucin	50,00
<b>Vitamine</b>	<b>mg/l</b>	L-Lysin*HCl	40,00
D-Biotin	0,20	L-Methionin	15,00
D-Ca Pantothenat	0,30	L-Phenylalanin	15,00
Cholinchlorid	3,00	L-Prolin	20,00
Folsäure	1,00	L-Serin	30,00
i-Inositol	35,00	L-Threonin	20,00
Nikotinamid	1,00	L-Tryptophan	5,00
Para-Aminobenzoesäure	1,00	L-Tyrosin	20,00
Pyridoxal*HCl	1,00	L-Tyrosin (Di-Natrium-Salz)	--
Riboflavin	0,20	L-Valin	20,00
Thiamin*HCl	1,00		
Vitamin B <sub>12</sub>	0,005		

Entsprechend den Angaben von FÖRLIN & ANDERSSON (1985) zu Leberproben von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) wurde darauf geachtet, dass die mit PBS gewaschenen Proben schwerer als 1 g direkt nach der Sektion in mehrere gleichgroße Stücke aufgeteilt wurden, um ein schnelles Durchfrieren der Proben zu garantieren. In deren Versuchen zeigte sich, dass zu lange Lagerung der frischen Proben über Trockeneis zu

einem erheblichen Verlust der Cytochrom-Aktivitäten führte. Den weiteren Ergebnissen, dass isolierte Mikrosomen nicht ohne Verlust der Enzymaktivitäten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden können, sondern nur dann ihre Integrität diesbezüglich bewahren, wenn sie zusätzlich mit 20% Glycerol versetzt werden, wurde durch die Zusammensetzung des Lagermediums Rechnung getragen: 10% DMSO-Lösung, 10% Fötale Rinderserum, 80% Zellkulturmedium. Diese Zusammensetzung gewährleistet den Erhalt der Gewebestruktur auch nach dem Auftauprozess (SHORE & RADWAY 2000), da durch Tiefrieren und Auftauen die Membranstruktur des Gewebes verändert wird. Die Zerstörung der Zellen äußert sich häufig auch in einer Verringerung der Enzymaktivität. Die Wirkung des Cryoprotektors DMSO beruht in diesem Zusammenhang darauf, dass durch die Vermengung mit der Gewebeflüssigkeit eine Eiskristallbildung und die dadurch bedingte Zerstörung des Gewebes weitestgehend vermieden werden kann. Auf die weiteren Forderungen von MONOD & VINDIMIAN (1991), die Proben unmittelbar nach Sektion zu homogenisieren, wurde wegen des dadurch bedingten Verlustes der strukturellen Informationen verzichtet.

Wie oben bereits erwähnt, kann zu schnelles Einfrieren zur Bildung von Eiskristallen in der Zelle führen und somit die Zerstörung von Organellen und der Cytoplasmamembran zur Folge haben. Die Eiskristallbildung ist hierbei abhängig von der Geschwindigkeit des Temperaturabfalles, der tiefsten erreichten Temperatur, der Dauer der Tiefkühlung, dem Volumen des gefrorenen Gewebsanteils und dem Zeitablauf des Auftauens (HENGSTLER 2000a, LINDL 2002). Umgekehrt kann zu langsames Einfrieren durch Dehydratation zum Zelltod führen. Beim langsamen Einfrieren kommt es oft zu örtlich begrenzten Kanal- und Inselbildungen im nichtgefrorenen Medium mit dem Effekt starker lokaler Konzentrationsgefälle und daraus folgender Membranschädigung. Die Ursache für alle auftretenden Probleme sind Konzentrationsungleichgewichte, die sich während des Einfrier- bzw. Auftauvorgangs im Gewebe und in der das Gewebe umgebenden Lösung bilden. Die Vermeidung dieser Fehler erfolgt durch den Einsatz frostschtützender Additive. Durch ihre hohe Affinität zu Wasser verhindern diese die Bildung von Eiskristallen. Aus diesem Grund werden dem Kulturmedium 10%iges Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt.

In diesem Zusammenhang wurde von mehreren Arbeitsgruppen (HENGSTLER et al. 200a, HENGSTLER et al. 2000b) auf die Bedeutung des Timings beim Einfriervorgang hingewiesen. Umfangreiche Untersuchungen von HENGSTLER et al. (2000a) zur Abhängigkeit der Hepatozyten-Reaktivierung von der Einfriertechnik erbrachten, dass die *relative viability after cryopreservation* ansteigt, wenn die Proben langsamer eingefroren werden. Mit dem Protokoll zur Temperaturerniedrigung mit maximal  $2^{\circ}\text{C}$  pro Minute wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wie mit dem deutlich komplizierteren *shock cooling step*-Verfahren (vgl. Tab. 4).

**Tab. 4: Abhängigkeit der relativen „Überlebenswahrscheinlichkeit“ (Trypan Blue Exclusion) von Ratten-Hepatozyten von der Einfriergeschwindigkeit (nach HENGSTLER et al. 2000a)**

Methode	Beschreibung	Reaktivierung [%]
direct freezing in liquid nitrogen	einfaches Überführen der Proben in LIN (-100°C direkt erreicht)	27 ± 21
fast linear freezing protocol	einfaches Überführen der Proben über LIN (-100°C nach 2 min erreicht)	48 ± 3
slow linear freezing protocol	Einfrieren der Proben von ca. 2°C pro Minute (-100°C nach 50 min erreicht)	79 ± 5
slow freezing protocol with shock cooling step, version no. 1	langsames Einfrieren der Proben bis -60°C, dann Schockgefrieren (-100°C nach 50 min erreicht)	81 ± 6
slow freezing protocol with shock cooling step, version no. 2	langsames Einfrieren der Proben bis -60°C, dann Schockgefrieren (-100°C nach 50 min erreicht)	86 ± 56

In der Praxis werden ebenfalls in aller Regel 1°C Temperaturniedrigung pro Minute (bis zu -80°C) als optimal angesehen (vgl. auch LINDL 2002). In den meisten Fällen werden dazu spezielle Einfrierkammern verwendet, allerdings werden auch fest schließende und mit Trockeneis gefüllte Styroporboxen empfohlen. Fest aggregiertes CO<sub>2</sub> hat eine Verdampfungstemperatur von -78,64°C und kühlt mit etwa 1°C pro Minute die Proben wesentlich langsamer herunter, als dies über „Fahrstuhlsysteme“ in der Gasphase über LIN geleistet werden kann. Diese Tatsache berücksichtigend wurden die Proben nach Überführung in das Lagermedium für 24 h über Trockeneis langsam eingefroren. Erst nach Erreichen von mindestens -60°C wurden die Proben für die Endlagerung in die Gasphase über LIN überführt.

Das Auftauen der Probe sollte unmittelbar über ein 37°C warmes Wasserbad erfolgen (LINDL 2002). Sobald die Probe komplett aufgetaut ist, sollte das Gewebe in ein Zentrifugenröhrchen mit dem 10fachen Volumen an Medium überführt werden. Zum Auswaschen der kryoprotektiven Substanzen wird die Probe umgehend bei 300x g für zehn Minuten zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Vor der weiteren Bearbeitung sollten die Zellen für mindestens 24 Stunden unangetastet bleiben.

Die hier am Beispiel der Milz beschriebene Vorgehensweise zur Probenbehandlung von Gewebeproben für retrospektive Wirkungsuntersuchungen kann als allgemeingültig verstanden werden. Die methodische Vorgehensweise ist aufgrund fehlender Spezifikation für gezielte Fragestellungen (z.B. spezielle Zusatzstoffe) vergleichsweise universell einsetzbar und bildet ebenfalls die Grundlage für eine mögliche Einlagerung der bereits oben genannten Gewebearten wie Leber oder Kopfnieren.

Trotz zahlreicher Untersuchungen bleibt nach wie vor unklar, wie lange sich derart behandelte Proben veränderungsfrei in Bezug auf die zur Diskussion stehenden Enzymaktivitäten in der Gasphase über flüssigem Stickstoff lagern lassen. Hierzu kann nur die UPB durch wiederholte Vergleichsanalysen mit frischem Probenmaterial über mehrere Jahre Aufschluss geben (KLEIN 2003).

## **5 Erstellung von *standard operating procedures* (SOPs)**

Im Rahmen dieser Teilaufgabe sollen – auf die vorangegangenen Arbeiten aufbauend – *standard operating procedures* (SOPs) für Blutplasma und Milzproben an Brassens erstellt werden. Sie sollen die Grundlagen für eine integere Probenahme und Probenbearbeitung enthalten und eine veränderungsfreie Lagerung garantieren, damit retrospektive Untersuchungen durchgeführt werden können. Diese Richtlinien sollen die Verfahrensschritte von der Probenahme über Probenbearbeitung und -einlagerung beschreiben und der Qualitätssicherung dienen.

Die folgenden Ausführungen wurden allerdings so konzipiert, dass sie als Ergänzung der dementsprechend fortzuschreibenden Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassens (KLEIN & PAULUS 1996) zu verstehen sind (vgl. Anhang: Fortschreibung der *SOP* Brassens in der Fassung vom Januar 2003). Die Punkte Zielsetzung (1), Funktion der Probenart (2) sowie Festlegungen für die Probenahme (4) und Biometrische Probencharakterisierung (6) bleiben unberührt. Die Punkte Zielkompartimente (3) und Durchführung der Probenahme (5) erfahren die in den beiden Folgekapiteln beschriebenen Ergänzungen.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass die folgenden Ergänzungen zur Blutplasmaprobenahme in dem Entwurf der Fortschreibung der Richtlinie (KLEIN et al. 2003, zugleich Anhang) bereits umgesetzt sind. Die Ergänzungen zur Milzprobenahme wurden wegen weiteren Forschungsbedarfs in der Fortschreibung noch nicht berücksichtigt.

## 5.1 Blutplasmaprobenahme – Ergänzung der SOP Brassens

### 5.1.1 Zielkompartimente

Blutplasma, ein Kompartiment des Vollbluts ohne Zellbestandteile, stellt auch in der klinischen Diagnostik die wichtigste Körperflüssigkeit dar. Essentielle Spuren- und Bulkenelemente werden hier homöostatisch geregelt. Aufgrund des Lipid-Gehaltes kann es auch zur Gehaltsbestimmung von organischen, fettlöslichen Xenobiotika herangezogen werden und eignet sich für weiterführende immunologische, ökotoxikologische sowie genotoxische Untersuchungen.

### 5.1.2 Durchführung der Probenahme

Die folgenden Ausführungen verstehen sich als Ergänzung des entsprechenden Kapitels der aktuellen Fassung (Januar 2003) der Richtlinie zur Probenahme und Probenlagerung Brassens (vgl. Anhang II).

#### Erforderliche Ausrüstung

- Fisch-Betäubungskiste BE 300 (Fa. Grassl, Schönau),
- 2x2,6 ml Polypropylenröhre mit Eindrückstopfen, heparinisiert (S-Monovette mit 10-30 I.E./ml Vollblut) (Sarstedt, Nümbrecht),
- 0,9 mm Kanüle, 38 mm Länge (Sarstedt, Nümbrecht),
- Laborpipetten mit entsprechenden Pipettenspitzen (0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl),
- mit Identifikation etikettierte Kryoröhrchen (PP) (Ø11 mm, L 47 mm, Inhalt max. 500 µl) (VWR International, Frankfurt; Bestell-Nr. 211F3211),
- kühlbare Laborzentrifuge mit Ausschwingrotor,
- Reinraumarbeitsplatz (Clean bench des Laborfahrzeugs),
- Lupe oder Binokular,
- Edelstahlgefäß, Pappprackeinsätze und wasserfester Faserstift zur Verpackung.

#### Technische Vorbereitungen

Zur Verhinderung der Blutgerinnung werden als Probengefäße bereits mit Heparin-Lösung (10-30 I.E./ml) versetzte S-Monovetten verwendet. Die Röhrchen sind geschlossen (Filtersystem).

Die zur Einlagerung bestimmten Probengefäße (Kryoröhrchen aus PP; VWR International, Frankfurt) werden mit kryotauglichen und mit Identifikation versehenen Etiketten (ESTO,

Potsdam) beklebt. Die mit Silikondichtring versehenen Röhrcchen verhindern Gasaustausch. Die Röhrcchen bleiben bis kurz vor der Aliquotierung geschlossen.

### **Probenahmetechnik**

Um äußere Verletzungen und dadurch bedingten Blutverlust zu vermeiden ist zur Betäubung des Fisches die Methode der elektrischen Durchströmung anzuwenden.

Die Probenahme des Vollblutes erfolgt mittels einer Monovette mit Kanüle (0,9 mm) durch Herzstich von außen. Dabei wird die Monovette so geführt, dass die Kanüle durch den geöffneten Kiemendeckel die Kiemenwand unmittelbar über dem Knochenboden durchsticht. Die Kanüle wird in Abhängigkeit von der Größe des Fisches etwa 1 cm eingeführt, so dass die Entnahme des Blutes direkt aus dem Herzen ermöglicht wird.

Die Vollblutprobe wird bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Die Trennung Blutplasma/Zellfraktion muss spätestens zwei Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt werden, um eine Hämolyse weitgehend auszuschließen. Sie erfolgt in einer kühlbaren Tischzentrifuge (2°C) für 10 min bei 3000 U/min.

Nach Zentrifugation wird das Blutplasma abpipettiert und in eine festgelegte Anzahl (z.Z. n=10) von entsprechend beschrifteten Kryoröhrcchen (PP) überführt. Es werden Aliquote von mindestens 100 µl Blutplasma angefertigt, die unmittelbar nach Abschluss der Arbeiten über LIN eingelagert werden.

Hinsichtlich der Probencharakterisierung für hormonelle Untersuchungen ist eine exakte Definition des Geschlechts des Fisches unerlässlich. Dazu ist anhand der Gonade mittels Lupe oder Binokular das Geschlecht des Fisches zu bestimmen.

## **5.2 Milzprobenahme – Ergänzung der SOP Brassens**

Diese *standard operating procedure* definiert die Probenahme, Probenbearbeitung und -lagerung einer Gewebeprobe am Beispiel der Milz. Entsprechend der bisherigen Nutzung der Leber als UPB-Homogenat-Lagerprobe für die Elementanalytik kann die Leber zur Zeit keine Berücksichtigung als Einzelprobe für die Wirkungsanalyse finden. Die Probenahmetechnik (Kap. 5.2.2) ist allerdings so definiert, dass sie sowohl für Milz, als auch für die Leber eingesetzt werden kann.

### 5.2.1 Zielkompartimente

Die Milz gilt bei Fischen als das wichtigste blutspeichernde Organ, das als wichtigster Reifungsort für Immunzellen für die Immunabwehr mitverantwortlich ist. Die Milz ist deshalb insbesondere hinsichtlich immunologischer Untersuchungen von besonderer Bedeutung.

### 5.2.2 Durchführung der Probenahme

Die folgenden Ausführungen verstehen sich als zusätzliche Ergänzung des entsprechenden Kapitels der aktuellen Fassung (Januar 2003) der Richtlinie zur Probenahme und Probenlagerung Brassen.

#### Erforderliche Ausrüstung

- 20 ml PBS-Puffer (GIBCO, Karlsruhe) [pro Probe 20 ml],
- 10%ige DMSO-Lösung als Lagermedium [pro Probe 20 ml], Zusammensetzung: 10% Dimethylsulfoxid, 10% Fötale Rinderserum (GIBCO, Karlsruhe) und 80% Zellkulturmedium RPMI 1640 Medium (GIBCO, Karlsruhe),
- etwa 6 Falconer-Röhrchen (50 ml) zum Waschen der Milz,
- Skalpell (inkl. Skalpellklingen), Edelstahlpinzette und Teflon-Arbeitsplatte,
- mit Identifikation etikettierte Szintillationsgefäße (PP) (ROTH, Karlsruhe) (Ø 27 mm, L 60 mm, Inhalt ca. 20 ml),
- Styroporbox mit Trockeneis,
- Reinraumarbeitsplatz (Clean bench des Laborfahrzeugs),
- Edelstahlgefäß und wasserfester Faserstift zur Verpackung.

#### Technische Vorbereitungen

Das Ansetzen der DMSO-Lösung erfolgt unter sterilen Bedingungen. Zur Vermeidung der Bildung von Bakterienkulturen ist der Flaschenhals nach Befüllung mit dem Medium mit einem Bunsenbrenner (mind. 200°C) für ca. 60 sec zu sterilisieren.

Die zur Einlagerung bestimmten Probengefäße (Szintillationsgefäße aus PP; ROTH, Karlsruhe) werden mit kryotauglichen und mit Identifikation versehenen Etiketten (ESTO, Potsdam) beklebt. Die Gefäße bleiben bis zur Befüllung mit der DMSO-Lösung und Überführung der Milzproben geschlossen.

### **Probenahmetechnik**

Die Sektion des Fisches erfolgt nach der Richtlinie zur Probenahme und Probenlagerung für Brassens (KLEIN & PAULUS 1996).

Die bisher nach Wiegung verworfene Milz wird in ein Falconer-Röhrchen mit mind. 20 ml PBS-Puffer (GIBCO, Karlsruhe) überführt und durch Schütteln für etwa 20 min von Blutresten befreit. Gegebenenfalls muss dieser Vorgang wiederholt werden. Im Anschluss daran wird die Milz mit Hilfe eines Skalpell in mehrere gleichgroße Teile geschnitten, die umgehend in mit etwa 20 ml DMSO-Lösung gefüllte und mit der entsprechenden Identifikation etikettierte Szintillationsgefäße überführt werden. Die Probengefäße werden für etwa 24 h in einer Styroporbox auf Trockeneis gelagert, ehe sie über LIN überführt werden. Die Zwischenlagerung auf Trockeneis ermöglicht ein langsames Einfrieren der Probe (vgl. Kap. 4.3).

Anmerkung: Bei entsprechendem Bedarf können die Milzteile auch einzeln verpackt werden (z.B. pro 2 ml-PP-Kryoröhrchen ein 100 mg-Milz-Teilstück mit 1,5 ml DMSO-Lösung).

## **6 Durchführung von Blutplasma- und Milzprobenahmen im Jahr 2002**

Im Zeitraum vom 14.07.2002 bis 19.09.2002 wurden alle UPB-Brassen-Probenahmen des Jahres 2002 nach der Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassens der Umweltprobenbank des Bundes (KLEIN & PAULUS 1996) durchgeführt. Im Rahmen der Routineprobenahmen der UPB im Jahr 2002 wurden insgesamt 274 Brassens gefangen (vgl. Tab. 5). Zusätzlich wurden im Rahmen des Zusatzprojektes 2002 „*Die Donau als weiteres Probenahmegebiet der Umweltprobenbank des Bundes – Untersuchungen zur Vorbereitung von Probenahmen an limnischen Probenarten*“ an drei Screeningflächen insgesamt 59 Brassens beprobt.

An allen genannten Probenahmeflächen wurden im Rahmen dieses Pilotprojektes die ersten 20 beprobten Brassens für die vorliegenden Untersuchungen berücksichtigt.

**Tab. 5: Stichprobengrößen der untersuchten Parameter bei den Routine-Probenahmen 2002 in Rhein, Elbe, Saale, Mulde, Saar und im Screening Donau 2002**

<b>PNG</b>	<b>PNF</b>	<b>n (Ind. PN)</b>	<b>n (Blutplasma)</b>	<b>n (Milz)</b>	<b>n (♂ Gonaden)</b>
Saar	Güdingen	20	20	20	19
	Rehlingen	20	19	20	6
Rhein	Weil	16	16	16	11
	Iffezheim	20	20	20	5
	Koblenz	28	20	20	6
	Bimmen	19	19	19	3
Elbe	Prossen	23	20	20	11
	Zehren	25	20	20	7
	Barby	22	20	20	8
	Cumlosen	20	20	20	8
	Blankenese	20	20	20	14
Saale	Wettin	20	20	20	8
Mulde	Dessau	21	20	20	7
Donau	Ulm	18	18	18	11
	Kelheim	21	20	20	13
	Jochenstein	20	20	20	8
<b>SUMME</b>		<b>333</b>	<b>312</b>	<b>313</b>	<b>145</b>

Dementsprechend liegen zur Zeit zu 312 Individuen Blutplasmaproben vor. Bei den Probenahmen wurden jeweils zwölf Aliquote angefertigt, von denen zwei für die in Kap. 7 beschriebene Eingangskarakterisierung verwendet wurden. Zehn Aliquote wurden direkt über LIN für weitere Analysen gelagert, gemäß der Identifikation der UPB verschlüsselt, und sind zur Überführung in das UPB-Lager der IME Schmallebenberg bereitgestellt.

Die bisher bei der Probenahme seziierte, gewogene und anschließend verworfene Milz wurde entsprechend den in Kap. 4 angeführten Verfahrensrichtlinien separat weiterverarbeitet und ebenfalls über LIN eingelagert. Zur Zeit liegen somit von 313 der im Jahr 2002 beprobten Brassens zusätzlich auch eine in DMSO gelagerte Milzprobe vor. Die Proben werden bis zur weiteren Verwendung im Zwischenlager in Trier gelagert.

Aufgrund der Tatsache, dass strukturelle Veränderungen in männlichen Gonaden als Anhaltspunkt einer Wirkung von hormonell wirksamen Substanzen betrachtet werden können, wurden bei den Probenahmen 2002 zusätzlich männliche Gonaden entnommen und histologisch analysiert. Insgesamt 159 Proben wurden dem untersuchenden Institut (Institut für Zoologie der Universität Heidelberg – AG Aquatische Ökologie und Ökotoxikologie) übergeben. Die angefertigten histologischen Schnitte wurden mittels Digitalkamera in jpg-Format abgespeichert und liegen in Trier vor (CD-Rom mit 590 Bildern; 521 MB).

# 7 Vtg-Untersuchungen mittels Immuno-Assay (ELISA)

## 7.1 Vorbemerkungen

Die Bestimmung von Vitellogenin (Vtg) in Blutplasma von männlichen Fischen ist mittlerweile eine weitverbreitete Methode zur Untersuchung östrogenen Wirkungen bei eierlegenden Tieren (z.B. SOLE et al. 2000). Hintergrund hierfür ist, dass die Synthese von Vtg östrogen abhängig ist. Vtg ist ein großes Lipoglycophosphoprotein, das normalerweise von der Leber weiblicher Fische nach östrogenen Stimulation sekretiert wird. Von dort aus gelangt es im Blut zu den Ovarien, wo es von den sich entwickelnden Oozyten aufgenommen und zur Eigelbbildung verwendet wird. Männchen und nicht geschlechtsreife Weibchen produzieren kein Vtg bzw. nur in sehr geringen Mengen. Die Bildung von Vtg in Männchen ist möglich, weil sie Träger des Vtg-Gens sind, dessen Expression durch östrogen wirksame Substanzen ausgelöst werden kann. Deshalb kann der Nachweis von Vtg in männlichen Fischen als Hinweis einer östrogenen Wirkung gewertet werden. Normalerweise wird Vitellogenin durch Radioimmunoassays (RIA) oder Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) im Blutplasma nachgewiesen. Der Einsatz von Antikörpern führt dazu, dass diese Test sehr spezifisch auf eine oder wenige Arten zugeschnitten sind. TYLER et al. (1996) konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass ein für Karpfen (*Cyprinus carpio*) entwickelter RIA auch für *Abramis brama* adäquate Ergebnisse erbrachte, das heißt, dass sowohl Veränderungen des Vitellogeningehaltes als auch absolute Konzentrationen quantifiziert werden konnten.

Nachdem im Rahmen der oben beschriebenen Voruntersuchungen die Eignung von Blutplasma als individuelle UPB-Probe dargelegt werden konnte, sollte am Beispiel von Vtg die Eignung der nach den beschriebenen Methoden gewonnenen Blutplasmaproben überprüft werden. Vtg wurde deshalb ausgewählt, weil es zum einen vergleichsweise einfach nachzuweisen ist, und zum anderen einen relativ zuverlässigen Marker für den Nachweis östrogenen Wirkung darstellt.

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten dementsprechend erstmals die Vtg-Gehalte aller im Jahr 2002 beprobten Individuen der Probenahmeflächen der UPB untersucht und ein (umfassender) Überblick über die endokrine „Belastung“ der Individuen verschiedener Fließgewässer in Deutschland dargestellt werden. Dazu wurden die Blutplasmen von 160 männlichen Individuen von 17 Probenahmeflächen mittels ELISA auf Vtg analysiert. Zur Überprüfung der Methode wurden neben den Männchen auch die Plasmen weiblicher Fische (n=147) untersucht, die während der Phase der Eireifung natürlicherweise Vtg produzieren, zu denen aber bisher nur wenige Kenntnisse zum Vtg-Spiegel außerhalb der Laichphase

vorliegen (vgl. HECKER 2002). Mit dieser zusätzlichen Untersuchung sollte überprüft werden, welcher Informationsgehalt aus den Proben von weiblichen Fischen außerhalb der Laichperiode gewonnen werden kann.

## **7.2 Methoden**

Die Bestimmung der Vtg-Konzentrationen im Plasma der Fische wurde mit dem ELISA-Kit Vtg-103 (Biosense Laboratories, Bergen, Norwegen) nach dem Prinzip des indirekten Sandwich-Verfahrens durchgeführt.

### **Präparation der ELISA-Platten**

Der Anti-Karpfen Vtg-Antikörper wurde mit PBS-Puffer 1:100 verdünnt. Die verdünnte Antikörperlösung wurde in die 96-Wellen je Mikrotiterplatte pipettiert (je 100 µl pro Well) und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Platten mit Tween-PBS Puffer gewaschen, pro Well mit 150 µl 1% Bovine-Serum-Albumin (BSA) in PBS geblockt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Tween-PBS waren die Mikrotiterplatten für den ELISA-Test vorbereitet.

### **Präparation der Standards**

Der im Kit enthaltene getrocknete Vtg-Standard wurde aus Karpfen isoliert und zu Pulver lyophilisiert. Der lyophilisierte Karpfen-Vtg-Standard wurde gegen gereinigtes Karpfen-Vtg bei 280 nm quantitativ kalibriert. Für den Test wurde eine Standardreihe mit Blocking/Dilution-Lösung (1% BSA in PBS) im Konzentrationsbereich 0,12-125 ng Karpfen-Vtg/ml erstellt.

### **Probenverdünnung**

Um das gesamte Konzentrationsspektrum abzudecken wurden alle Plasmaproben mit Blocking/Dilution-Lösung (1% BSA in PBS) jeweils 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 verdünnt.

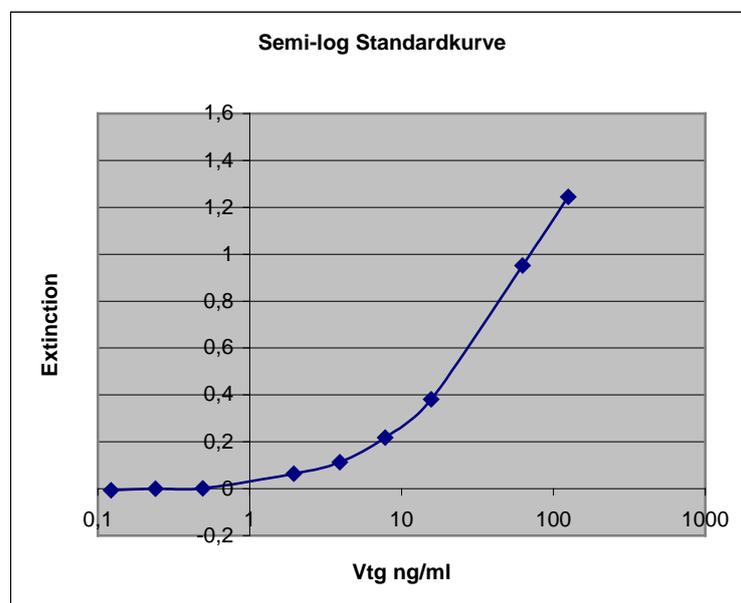
### **ELISA**

100 µl verdünnte Plasmaprobe bzw. Standards wurden in die beschichteten Wells gegeben und bei 37°C 1 Stunde inkubiert. Der Detecting-Antikörper wurde mit Blocking/Dilution-

Lösung 1:500 verdünnt. Nach der Inkubation wurden die Mikrotiterplatten 3x gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl der Detecting-Antikörper-Lösung pro Well wurde erneut eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der zweite Antikörper (anti-rabbit Ig) wurde mit Blocking/Dilution-Lösung 1:2.000 verdünnt und je 100 µl dieser Lösung nach den Waschvorgängen in jedes Well pipettiert. Die anschließende Inkubation mit je 100 µl Substrat (Herstellung siehe Arbeitsanleitung) erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 Minuten. Diese Farb-Reaktion wurde mit 50 µl einer 4 N Schwefelsäure gestoppt. Nach fünf Minuten wurde die Farbintensität (transparent bis gelb) mittels einem ELISA-Leser (MRY-Mikroplatten-Leser, Dynatech. Lab.) bei 490 nm gemessen. Bei der Blindprobe wurde als Probelösung Blocking/Dilution-Lösung eingesetzt.

### Auswertung

Abb. 12 zeigt die Standardkurve für den Nachweis von Vtg in Brassen. Für die Auswertungen wurden die Vtg-Konzentrationen in den Brassenplasma-proben mittels optimierter semi-logarithmischer und logarithmischer Standardkurve ( $R^2 \geq 0,98$ ) berechnet. Unter Berücksichtigung der geringsten Verdünnung (1:1000) kann der Vtg-Gehalt nur über 1 µg/ml mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden; Werte <1 µg/ml wurden für die Auswertung gleich Null gesetzt.



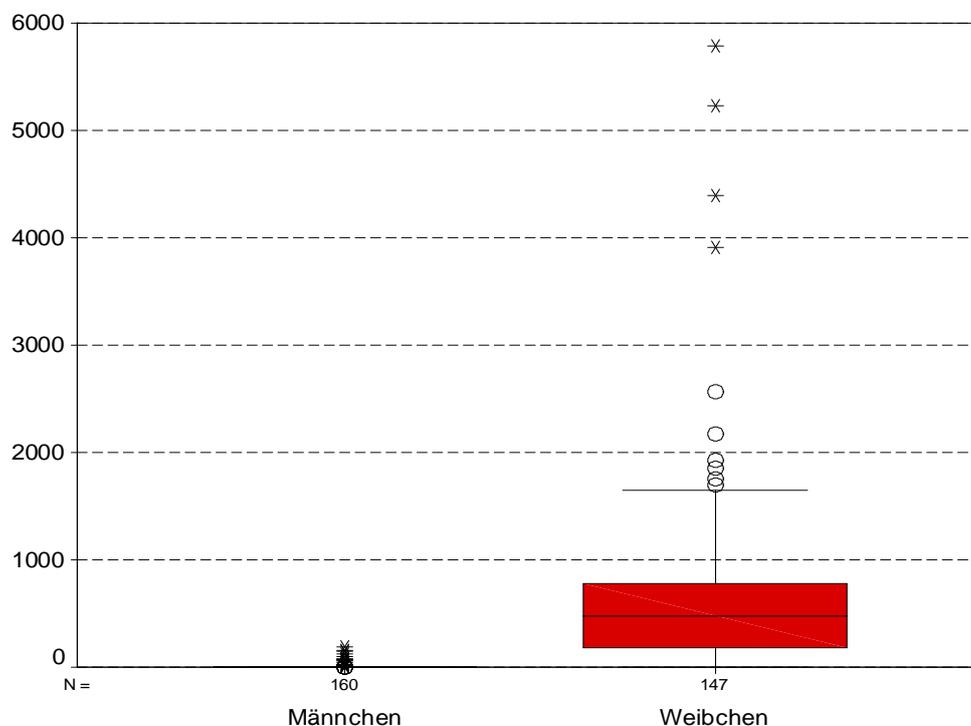
**Abb. 12:** Standardkurve zur Auswertung der Vtg-Konzentrationen

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form von Box&Whisker-Plots nach SPSS 10.0. Dabei handelt es sich um Diagramme auf der Grundlage des Medians (quer über die Box

gelegte Linie), der Quartile und Extremwerte. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar. Die von der Box ausgehenden Linien führen jeweils bis zum höchsten und niedrigsten Wert, ohne Ausreißer zu berücksichtigen. Ausreißer sind Fälle mit Werten, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind (Kreissymbol). Liegen die Werte über 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt, wird von Extremwerten gesprochen (Sternsymbol).

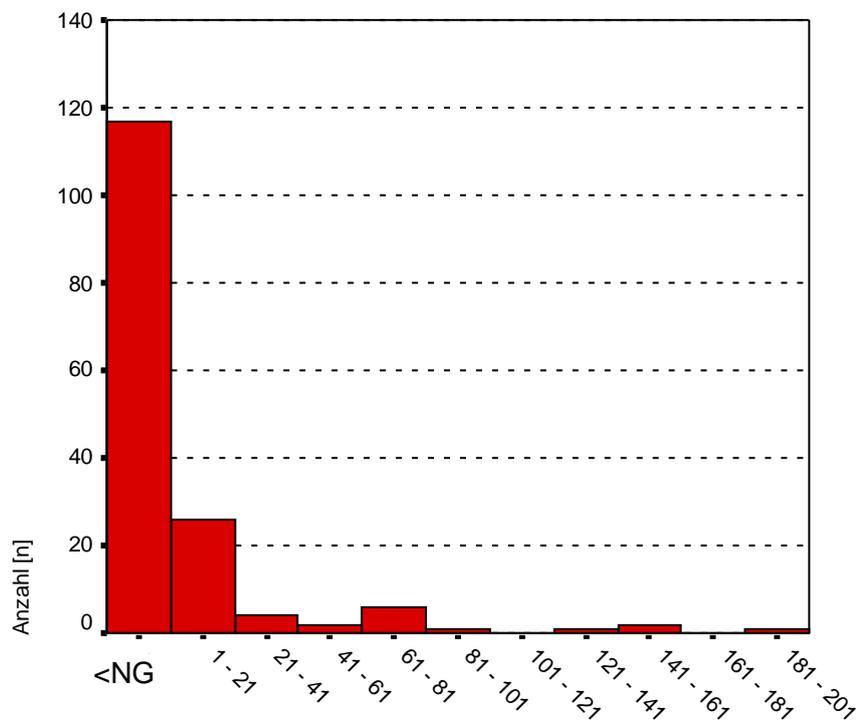
### 7.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 307 der 312 in Tab. 5 aufgeführten Tiere analysiert ( $\sigma = 160$ ,  $\text{♀} = 147$ ). Aus Abb. 13 wird ersichtlich, dass die beiden Geschlechter deutlich unterschiedliche Vtg-Gehalte aufwiesen. Während in den männlichen Proben maximal 189  $\mu\text{g/ml}$  Blutplasma nachweisbar waren, konnten in den Plasmen der weiblichen Tiere Vtg-Konzentrationen im Bereich zwischen der Bestimmungsgrenze (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und 5788  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt werden (vgl. auch Anhang I: Tabelle der Rohdaten). Aus diesem Grund werden die Ergebnisse der Vtg-Analyse der beiden Geschlechter in der Folge getrennt voneinander betrachtet.



**Abb. 13:** B&W-Plots der Vitellogeningehalte [ $\mu\text{g/ml}$ ] der untersuchten männlichen (links) und weiblichen Tiere (rechts) von allen Probenahmefflächen

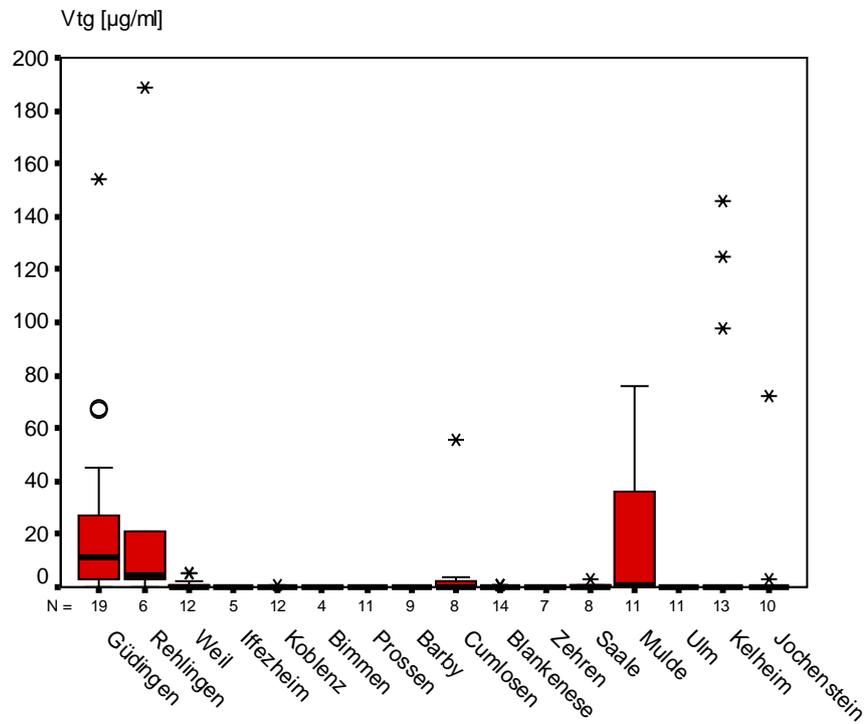
Betrachtet man die Vtg-Gehalte der untersuchten männlichen Brassen nach Klassen, so wird deutlich, dass in 117 der 160 untersuchten männlichen Individuen kein Nachweis von Vtg erbracht werden konnte. Lediglich bei 43 männlichen Individuen gelang ein Vtg-Nachweis (vgl. Anhang I und Abb. 14). Von diesen wurden für 26 Proben weniger als 21 µg Vtg/ml nachgewiesen, 12 Proben wiesen zwischen 20 und 80 µg Vtg/ml auf, während in 5 Proben mehr als 80 µg Vtg/ml detektiert wurde. Dies bedeutet zum einen, dass in lediglich in ca. 25% der Proben Vtg nachgewiesen wurde und zum anderen, dass davon nur wenige Proben quantitativ höhere Anteile aufwiesen.



**Abb. 14:** Histogramm der ermittelten Vitellogeningehalte (männliche Tiere) (<NG = kleiner Nachweisgrenze)

In diesem Zusammenhang ist vor allem die Verteilung der Vtg-Nachweise auf die einzelnen Probenahme­flächen interessant. Aus Abb. 15 geht hervor, dass in zehn der 16 untersuchten Probenahme­flächen Vtg in männlichen Tieren nachweisbar war. Lediglich an den PNFs Iffe­zheim, Bimmen (beide Rhein), Prossen, Zehren, Barby (alle Elbe) und Ulm (Donau) konnte kein Vtg nachgewiesen werden. Höhere Vtg-Gehalte wurden hierbei insbesondere in den bereits mehrfach untersuchten Standorten an der Saar und in der Mulde nachgewiesen, während die Tiere der übrigen Probenahme­flächen durchweg geringe Konzentrationen

aufwiesen. Unter Berücksichtigung der in Abb. 15 als Ausreißer dargestellten Vtg-Gehalte zeigt Tab. 6 statistische Kenngrößen der Vtg-Gehalte nach Standorten aufgeschlüsselt.

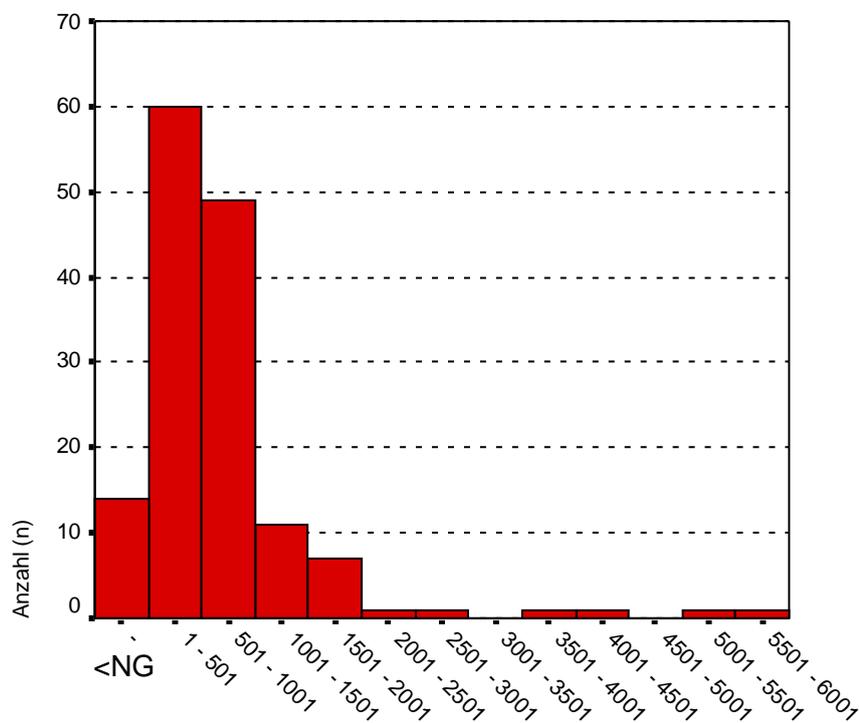


**Abb. 15: B&W-Plots der Vitellogeningehalte [µg/ml] nach Standorten (männliche Tiere)**

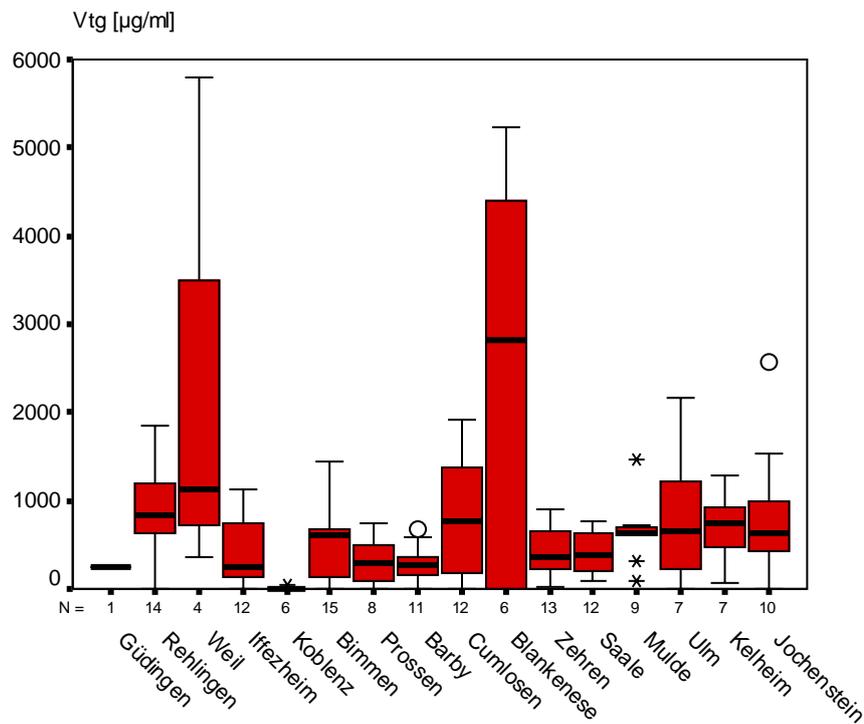
Wie oben bereits erwähnt, wurden neben den 160 männlichen Blutplasmaproben auch 147 von weiblichen Tieren gewonnene Proben auf ihren Vtg-Gehalt analysiert. Wie aus Abb. 13 hervorgeht, wurden Vtg-Gehalte bis 5788 µg/ml ermittelt. Lediglich in zwölf Proben konnte kein Vtg nachgewiesen werden und zwei Proben beinhalteten lediglich 1 µg Vtg/ml. In der Histogrammdarstellung (vgl. Abb. 16) wird deutlich, dass Vtg-Gehalte bis 2000 µg Vtg/ml als häufig bzw. „üblich“ betrachtet werden müssen, während höhere Gehalte die Ausnahme darstellen.

**Tab. 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der nach PNFs aufgeschlüsselten Vtg-Gehalte in männlichen Brassen**

Fluss	PNF	n	Vtg [ $\mu\text{g/ml}$ ] MW $\pm$ ST
Saar	Güdingen	19	26,0 $\pm$ 37,4
	Rehlingen	6	37,0 $\pm$ 74,8
Rhein	Weil	12	1,0 $\pm$ 2,0
	Iffezheim	5	< Nachweisgrenze
	Koblenz	12	< Nachweisgrenze
	Bimmen	4	< Nachweisgrenze
Elbe	Prossen	11	< Nachweisgrenze
	Zehren	7	< Nachweisgrenze
	Barby	9	< Nachweisgrenze
	Cumlosen	8	7,5 $\pm$ 19,7
	Blankenese	14	< Nachweisgrenze
Saale	Wettin	8	< Nachweisgrenze
Mulde	Dessau	11	20,3 $\pm$ 33,7
Donau	Ulm	11	< Nachweisgrenze
	Kelheim	13	28,4 $\pm$ 54,8
	Jochenstein	10	7,5 $\pm$ 22,7

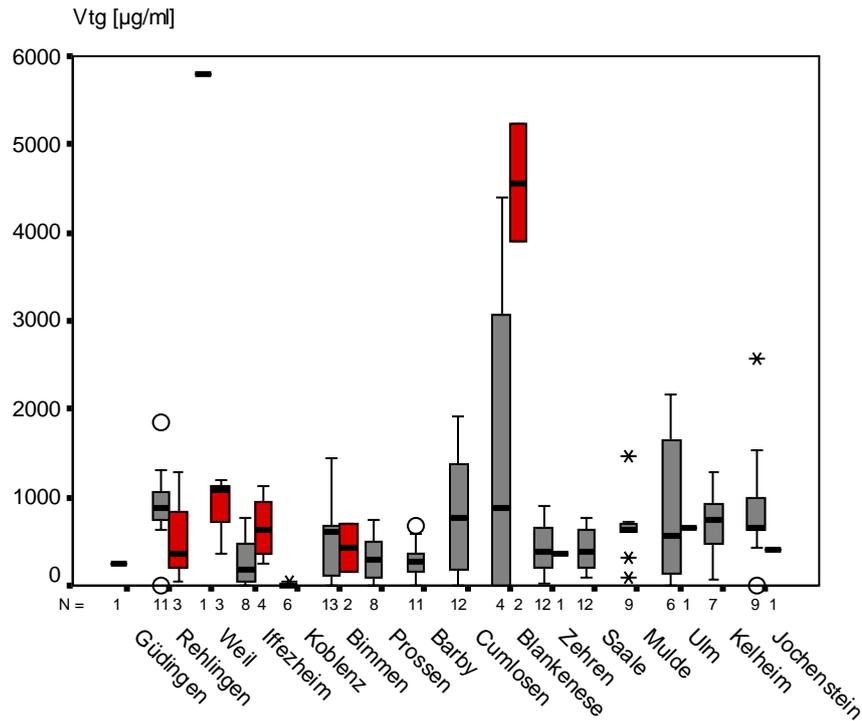
**Abb. 16: Histogramm der ermittelten Vitellogeningehalte (weibliche Tiere) (<NG = kleiner Nachweisgrenze)**

Unter Betrachtung der einzelnen Untersuchungsstandorte wird deutlich, dass diese hohen Vtg-Gehalte ausnahmslos an den Probenahme­flächen Weil (Rhein) und Blankenese (Elbe) ermittelt wurden (vgl. Abb. 17). Insbesondere in Blankenese wurden mit mittleren Werten von annähernd 3000 µg Vtg/ml deutlich höhere Konzentrationen nachgewiesen.



**Abb. 17: B&W-Plots der Vitellogeningehalte [µg/ml] der weiblichen Tiere nach Standorten**

In einigen weiblichen Tieren wurde bei der Probenahme zusätzlich das Vorhandensein von Eiern im Ovar dokumentiert. Abb. 18 trägt diesem Phänomen Rechnung, indem die Vtg-Gehalte der untersuchten Probenahme­flächen entsprechend diesem Merkmal den übrigen Proben gegenübergestellt wurden. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, dass die hohen Vtg-Gehalte der Plasmen von Blankenese annähernd ausnahmslos auf zum Zeitpunkt der Probenahme Eier tragende Tiere zurückzuführen sind.



**Abb. 18:** B&W-Plots der Vitellogeningehalte [µg/ml] der weiblichen Tiere nach Standorten (getrennt nach sichtbarer Erscheinung der in Gonaden enthaltenen Eiern = rot; grau = ohne Bemerkungen)

## 7.4 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte festgestellt werden, dass zum einen große Unterschiede zwischen den Vtg-Gehalten männlicher und weiblicher Tiere bestehen und zum anderen, dass die Gehalte auch innerhalb dieser beiden Gruppen an den untersuchten Probenahmeflächen sehr variabel sind.

Bei Betrachtung der männlichen Tiere ist hinsichtlich der gemessenen Vtg-Gehalte an den Probenahmeflächen Güdingen, Rehlingen und Mulde (Dessau) von einer Exposition gegenüber östrogen wirksamen Substanzen auszugehen. Um die ermittelten Daten bewerten zu können ist der Vergleich der Gehalte mit einer vergleichbaren Untersuchung interessant (BARTEL et al. 2002). Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Vtg-Gehalte in geschlechtsreifen männlichen Brassen aus der Saar analysiert. Die Proben wurden zwar zu einem anderen Probenahmezeitraum (Frühjahr) gewonnen, aber aufgrund der identischen methodischen Vorgehensweise mittels ELISA sollen diese Ergebnisse als Vergleichswerte herangezogen werden. Aus Abb. 19 wird deutlich, dass an fünf Saar-Standorten durchschnittliche Vtg-Gehalte von >100 µg Vtg/ml ermittelt wurden. Demzufolge wurden in

vorliegender Untersuchung in allen untersuchten Flusssystemen deutlich geringere Konzentrationen nachgewiesen als in der Saar 2001. Die vergleichsweise hohen Gehalte der Saar-Brassen 2001 wurden auf die zahlreichen, unmittelbar oberhalb der Untersuchungsstandorte befindlichen Kläranlageneinleiter zurückgeführt (BARTEL et al. 2002), da aus einigen Untersuchungen bekannt ist, dass vor allem Kläranlagen für den Eintrag östrogen wirksamer Substanzen in Vorflutern verantwortlich sind (HARRIES et al. 1996, 1997, FOLMAR et al. 1996, 2001a, ALLEN et al. 1999, KARELS 2001). Demzufolge konnte in der Untersuchung 2001 geschlossen werden, dass in den Fischen die hormonelle Wirkung durch andere Stoffe größer einzuschätzen ist, als auf endokrin wirksame Substanzen wie beispielsweise Nonylphenol. Bezug nehmend auf die vorliegende Untersuchung kann die deutlich geringere Belastung von Elbe, Rhein und Donau darauf zurückgeführt werden, dass zum einen im unmittelbaren Bereich der Probenahmeflächen keine Kläranlageneinleiter zu finden sind, oder zum anderen die größere Wasserführung einen deutlichen Verdünnungseffekt darstellt.

Im Vergleich der über beide Jahre analysierten Vtg-Gehalte der Saar-Probenahmeflächen Güdingen und Rehlingen wird darüber hinaus deutlich, dass in vorliegender Untersuchung sehr viel weniger Vtg als 2001 nachgewiesen wurde. Ob es sich in diesem Zusammenhang tatsächlich um einen Rückgang endokriner Belastung handelt, oder ob der Probenahmezeitpunkt und somit die Saisonalität eine tragende Rolle spielt, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt werden.

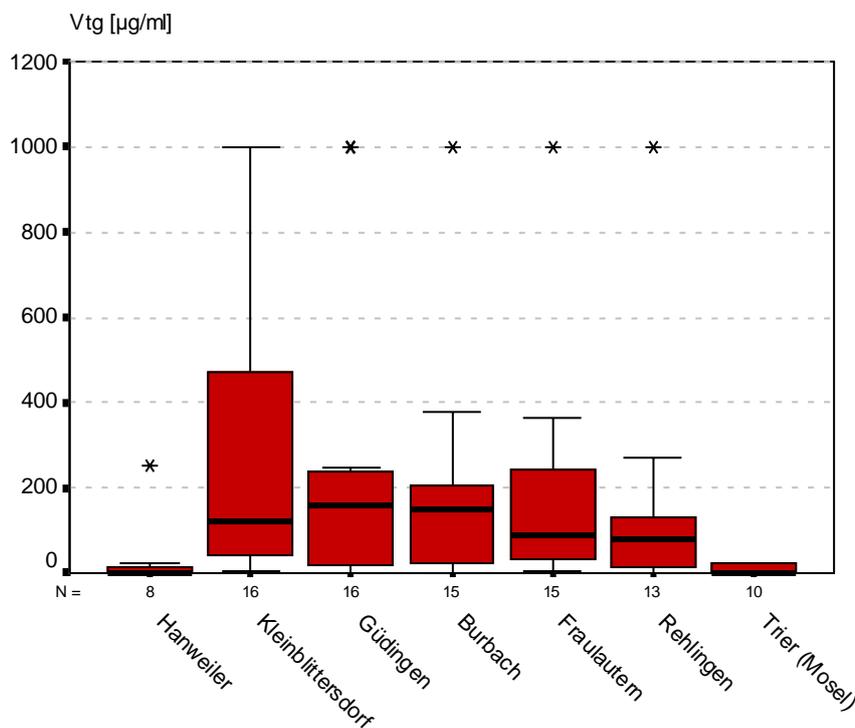


Abb. 19: Ergebnisse der Vtg-Analyse [µg/ml] in Brasses der Saar (BARTEL et al. 2002)

Über diese eigenen Untersuchungen hinaus liegen bisher nur sehr wenige Daten von vergleichbaren Untersuchungen vor, die eine Einordnung der gemessenen Konzentrationen ermöglichen. Allerdings wurden von LEHMANN et al. (2000) und KARBE et al. (2000) Vtg-ELISAs an Brassern unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt. Mit Mittelwerten von  $<1$   $\mu\text{g/ml}$  und Maximalwerten von  $50$   $\mu\text{g/ml}$  in der Elbe (KARBE et al. 2000) und Vtg-Gehalten bis zu  $2,8$   $\mu\text{g/ml}$  (Niederrhein, LEHMANN et al. 2000) zeigen beide Untersuchungen in etwa gleiche Konzentrationsbereiche wie die analysierten Individuen der beiden Flusssysteme in der vorliegenden Untersuchung. Fraglich ist allerdings, ob die Konzentrationen der verschiedenen Untersuchungen direkt miteinander verglichen werden dürfen. Bei Betrachtung der weiblichen Proben werden – unabhängig von der Jahreszeit – von diesen Autoren wesentlich geringere Vtg-Gehalte ermittelt (Rhein  $2,7$   $\mu\text{g/ml}$ ; Elbe  $100$   $\mu\text{g/ml}$ ).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in den untersuchten männlichen Individuen fast ausnahmslos Vtg-Gehalte unterhalb der Nachweisgrenze von  $1$   $\mu\text{g/ml}$  ermittelt wurden. Lediglich in den Populationen von Saar (Güdingen, Rehlingen) und Mulde (Dessau) wurden erhöhte Vtg-Gehalte ermittelt. Der Nachweis von Vtg kann in diesem Zusammenhang mit der Exposition und Bioverfügbarkeit endokrin wirksamer Substanzen gleichgesetzt werden. Da die Relevanz erhöhter Vtg-Gehalte für das Individuum bzw. für eine Population schwer zu bewerten ist (vgl. HARRIES et al. 1996), wurden zusätzlich männliche Gonaden hinsichtlich struktureller Veränderungen (z.B. Ovotestis) histologisch untersucht (vgl. Kap. 8). Die Ergebnisse der beiden Teilaufgaben werden zusammenfassend bewertet und diskutiert (vgl. Kap. 9).

Wie bereits mehrfach erwähnt, wird der Nachweis von Vtg in männlichen Brassern, welche diese Vorläufersubstanz der Dotterproteine natürlicherweise nicht bilden, als sicherer Hinweis auf die Anwesenheit von endokrin wirksamen Substanzen in der Umwelt der Fische angesehen. Dagegen muss die Bildung von Vtg in geschlechtsreifen Weibchen als ein natürlicher Prozess angesehen werden. Allerdings ist zur Zeit nur sehr wenig bekannt, wie sich der Vtg-Spiegel im Weibchen außerhalb der Laichzeit verhält (vgl. HECKER 2001). Es stellt sich somit die Frage, ob ihr Nachweis zumindest außerhalb der Laichzeit als Marker verwendet werden kann. Für den Probenahmezeitpunkt unmittelbar nach Abschluss der Laichphase wären demnach theoretisch niedrige Vtg-Gehalte in den weiblichen Gonaden zu erwarten. Die in vorliegender Untersuchung ermittelten Ergebnisse zeigen aber, dass zum einen auch außerhalb der Laichzeit sehr hohe Vtg-Gehalte nachgewiesen werden konnten und zum anderen, dass die Gehalte sowohl innerhalb als auch zwischen den Probenahmeflächen stark schwanken können.

Besonders auffällig sind die signifikant höheren Vtg-Gehalte der von weiblichen Tieren gewonnenen Blutplasmen der Probenahmefläche Blankenese. In diesem Zusammenhang ist

aus Untersuchungen von HECKER (2001) bekannt, dass es einen Jahresgang der Vtg-Konzentration in weiblichen Tieren gibt. Danach beginnt die Oogenese bzw. die Vitellogenese in weiblichen Brassen im Herbst und führt bereits in den Wintermonaten zu einem deutlichen Anstieg der Vtg-Konzentrationen. Die vergleichsweise hohen Vtg-Gehalte von Blankenese korrelieren demnach mit dem späteren Probenahmezeitpunkt und sind somit ein Hinweis auf die bereits erneut begonnene Vitellogenese. Zusätzlich gestärkt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die Eier tragenden Weibchen die Ursache für die hohen Vtg-Gehalte gerade an diesem Standort darstellen.

Zusammenfassend kann dementsprechend festgehalten werden, dass der Vtg-Gehalt hauptsächlich von der individuellen Entwicklung des Weibchens abhängig ist. Aus diesem Grund erscheint der Vtg-Gehalt in weiblichen Gonaden außerhalb der Laichzeit als Marker für endokrine Wirkung ungeeignet.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass aufgrund eines Fehlers bei der Probenlagerung die Proben der Standorte Prossen, Zehren, Barby, Cumlosen, Saale (Wettin) und Mulde (Dessau) zumindest kurzfristig auf- bzw. angetaut waren (ca. 24 h). Unter diesen Umständen muss – aufgrund des Fehlens von Proteinaseinhibitoren (vgl. Kap. 3.5.2) – theoretisch von einem Abbau der Vtg-Konzentrationen im Blutplasma ausgegangen werden. Betrachtet man jedoch die Plasmen der weiblichen Tiere der entsprechenden Probenahmeflächen, so wird deutlich, dass in diesen keine signifikant niedrigeren Vtg-Gehalte nachgewiesen wurden als in den Plasmen der nicht betroffenen weiblichen Tiere der Probenahmeflächen von Saar, Rhein und Donau sowie des separat beprobten Elbe-Standes Blankenese. Diese Feststellung bei den Plasmen männlicher Tiere zu treffen ist ungleich schwieriger, da die Gehalte der nicht betroffenen Proben in so niedrigen Bereichen liegen, dass ein Abbau von Vtg statistisch auch nicht nachweisbar wäre. Entsprechend den Herstellerangaben müsste sich ein möglicher Vtg-Abbau jedoch auf alle Proben in gleicher Weise ausgewirkt haben (Janne K. Eidem, Fa. BIOSENSE, Bergen, Norwegen; mündl. Mitteilung). Insofern kann aufgrund des erhöhten Vtg-Nachweises an den Probenahmeflächen Dessau und Cumlosen geschlossen werden, dass diese Problematik hinsichtlich der Bewertung der Ergebnisse nicht überbewertet zu werden braucht.

## 8 Histologische Untersuchungen der Gonaden der im Jahr 2002 beprobten Brassens

Neben den bisher beschriebenen Vtg-Gehalten in männlichen Individuen werden auch strukturelle Veränderungen in männlichen Gonaden als erster Anhaltspunkt einer Wirkung von hormonell wirksamen Substanzen bzw. als Marker für hormonelle Veränderung im Tier betrachtet (OLIVERAU & OLIVERAU 1979, JOBLING et al. 1996, GIMENO et al. 1998, LEHMANN et al. 1999, METCALFE et al. 2000, NOLAN et al. 2001, ZAROOGIAN et al. 2001). Auffallendstes histologisches Merkmal ist hierbei die Induktion von Mischgonaden (Ovotestis), d.h. die Bildung von Eizellen im Bereich der männlichen Gonade. Dieser Effekt wird im Zusammenhang der Induktion weiblicher Funktionen in den Gonaden männlicher Fische interpretiert und als deutlicher Hinweis auf endokrine Effekte eingestuft (MATTHIESSEN & SUMPTER 1998, NICHOLS et al. 2001, KNÖRR et al. 2002, SCHWAIGER et al. 2002); physiologisch wird die Ausbildung weiblicher Eigenschaften in den männlichen Gonaden i.d.R. von einer Synthese von Vitellogenin begleitet (BIEBERSTEIN et al. 1999, ISLINGER et al. 1999, SUMPTER & JOBLING 1996, SUMPTER et al. 1996, TYLER et al. 1998). Nachdem v.a. von den Arbeitsgruppe Karbe (Universität Hamburg) und LEHMANN (1999) auch bei Brassens aus deutschen Fließgewässern von der Induktion von Mischgonaden in männlichen Individuen berichtet worden war, sollten im Rahmen dieser Teilaufgabe die männlichen Brassens des Probenahmejahres 2002 auf histologische Veränderungen untersucht werden. Da die Gonaden wie andere Organe von Fischen jedoch nicht nur unter dem Einfluss endokrin wirksamer Substanzen stehen, sondern in gleicher Weise dem Einfluss einer Vielzahl anderer Umweltchemikalien ausgesetzt sind, wurden weitere histopathologische Veränderungen mit erfasst. Grundsätzlich ist in diesem Zusammenhang festzuhalten, dass eine Zuordnung eventueller Effekte zu bestimmten Stoff(grupp)en auf Grund des unspezifischen Charakters histopathologischer Veränderungen i.d.R. nicht möglich ist (MEYERS & HENDRICKS 1985, BRAUNBECK 1994).

Aus diesem Grund wurden neben der in Kap. 7 beschriebenen Vtg-Analyse an den entnommenen männlichen Gonaden histologische Schnitte vorgenommen, die Aufschluss darüber geben sollten, ob und inwieweit strukturelle Veränderungen in den Gonaden nachweisbar waren. Die histologische Analyse erfolgte durch das Institut für Zoologie der Universität Heidelberg (AG Aquatische Ökologie und Ökotoxikologie) (BRAUNBECK & MAHALUXMY 2003).

## 8.1 Methoden

Die Sektion der Fische erfolgte entsprechend der Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassen (KLEIN et al. 1996). Nach Öffnen der Bauchhöhle, Entnahme der Leber, der Milz und der Niere sowie nach Verwiegung der restlichen Innereien wurden die männlichen Gonaden von den restlichen Innereien seziert und in einer 4%igen Formaldehydlösung (pH 7,4-7,6; direkt aus Formaldehydlösung (mind. 37%, stabilisiert mit etwa 10% Methanol und Calciumcarbonat für die Histologie; z.B. Merck Best.-Nr. 103999) mit Aqua<sub>dest.</sub> verdünnt) für circa 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in einer neuen 4%igen Formaldehydlösung für 12-20 Stunden anfixiert. Nach Inkubation des Gewebes für 2x30 min in 0,1 M Cacodylatpuffer (0,1 M Cacodylsäure Natriumsalz(-Trihydrat) in Aqua<sub>dest.</sub>, 4°C, pH 7,6; z.B. Merck Best.-Nr. 103256) wurden die gereinigten Proben in einem mit 2,5% Glutardialdehyd (z.B. Merck Best.-Nr. 104239) versetzten 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,6) endfixiert und bei 4°C bis zur histologischen Analyse gelagert. In diesem Zustand wurden die Proben an das Institut für Zoologie der Universität Heidelberg verschickt.

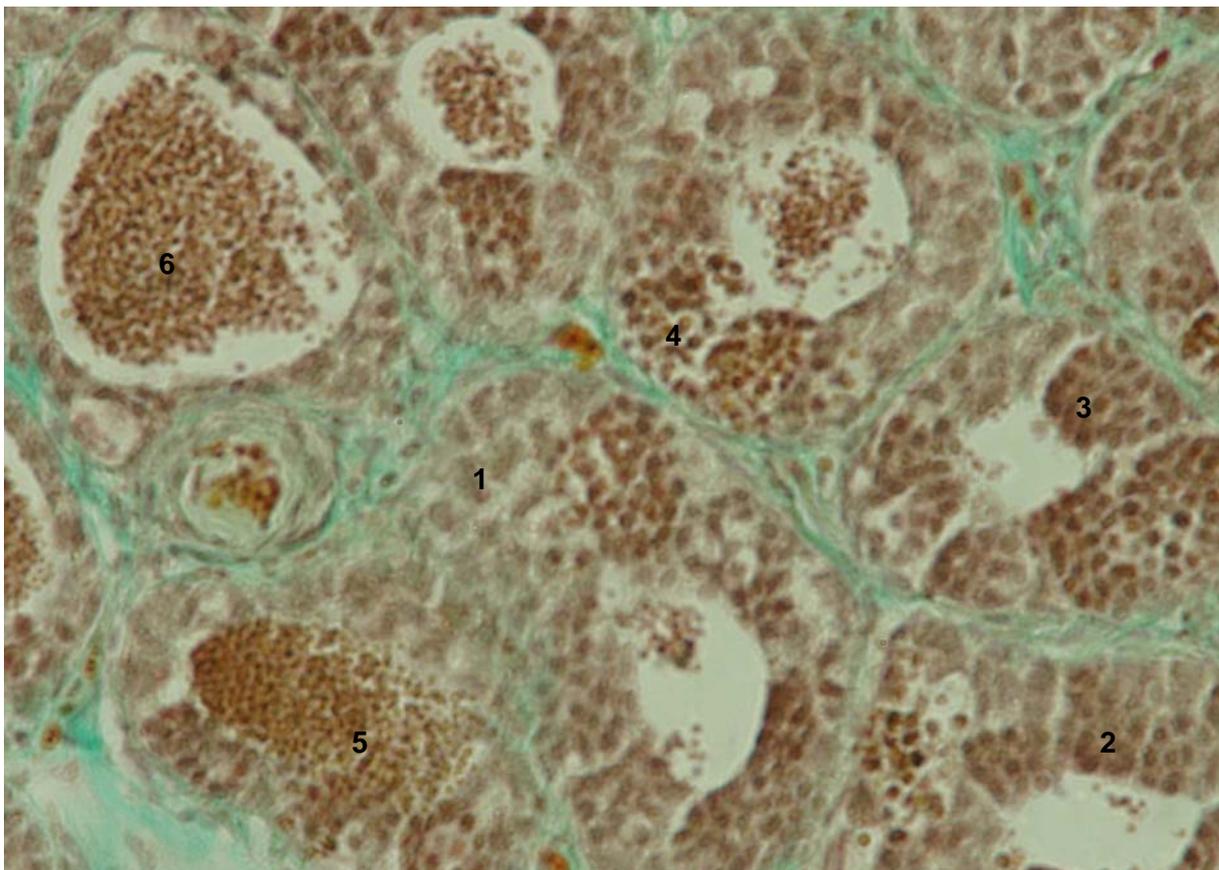
Dort wurden die Proben zur weiteren Aufarbeitung über eine aufsteigende Alkoholreihe (75, 85, 95 und 100% Ethanol für jeweils 3x10 min) entwässert und über Methylbenzoat als Intermedium in Paraffin (Paraplast; Serva, Heidelberg) eingebettet. Für lichtmikroskopische Übersichtsfärbungen wurden auf einem HN40-Schlittenmikrotom (Leica-Jung, Nussloch) mehrere 6 µm dicke Querschnitte mit einem Abstand von 20 bzw. 100 µm im Falle der Hoden bzw. Ovarien angefertigt und auf Glasobjektträger aufgezogen, die zuvor mit Eiweißglycerin beschichtet worden waren.

Vor der Färbung wurden die Schnitte für 15 min in 100% Xylol entparaffiniert, für 2 min in Isopropanol gewaschen und über eine absteigende Alkoholreihe (96, 80 und 70% Ethanol für jeweils für 2 min) in Wasser überführt. Die Schnitte wurden entweder mit der Masson'schen Trichromfärbung (modifiziert nach GOLDNER 1938) oder mit Hämatoxylin und Eosin nach BÖCK & ROMEIS (1989) gefärbt. Nach den Färbungen erfolgte die Rückführung über Isopropanol in Xylol. Die Schnitte wurden mit DePeX (Serva, Heidelberg) eingedeckt und anschließend in einem Leitz Aristoplan Lichtmikroskop mit einer digitalen Kamera (Canon EOS D60) ausgewertet. Pro Gonade wurden mindestens 6 Schnitte ausgewertet.

## 8.2 Vorbemerkungen

### 8.2.1 Normalstruktur des Hodens von Cypriniden

Die Testes von Knochenfischen sind meist paarige, langgestreckte Strukturen, die beidseitig dorsal in der abdominalen Körperhöhle verlaufen und über Mesenterien dorsal aufgehängt sind. Auf jedem Hoden verlaufen bei den meisten Cypriniden ca. 5 Ducti efferenti, die die reifen Spermien aus den Tubuli seminiferi aufnehmen und sie zur Genitalpapille führen. Die Tubuli seminiferi sind durch dünne Bindegewebslamellen getrennt und bilden ein engmaschiges Netzwerk, in dessen Wänden sich die Spermatogonien und Spermatozyten innerhalb von sog. Spermatocysten befinden (EWING 1972). Die Spermatogenese läuft innerhalb der Spermatocysten, deren Wände von Sertoli-Zellen gebildet werden, synchron ab (PUDNEY 1995). Die fertig entwickelten Spermien gelangen nach der Auflösung der Cystenwand in das Tubuluslumen (GRIER 1981).



**Abb. 20:** Histologie des Teleosteer-Hodens und der die Spermatogenese durchlaufenden Zellstadien am Beispiel des Männchens Jochenstein 17 (1=primäre Spermatogonie, 2=sekundäre Spermatogonie, 3=primäre Spermatocyte (z.T. während der ersten meiotischen Teilung), 4=sekundäre Spermatocyte (z.T. während der zweiten meiotischen Teilung), 5=Spermatide, 6=Spermium, grün=Bindegewebe zwischen den Tubuli semiferi) (250x, Goldner-Färbung)

### **8.2.2 Normalstruktur der Ovarien von Cypriniden**

Die Ovarien sind wie die Hoden paarige, langgestreckte Strukturen, die beidseitig dorsal in der Körperhöhle verlaufen und immer getrennt voneinander angelegt sind. Der Reifegrad der Ovarien wird über die unterschiedlicher Reifestadien der Oozyten, die anhand charakteristischer Merkmale voneinander unterschieden werden können, definiert. Die folgende Beschreibung nach TAKASHIMA (1986) und SELMAN et al. (1993) gilt für Färbungen mit dem Goldner-Gemisch.

#### **Reifestufe I – Primäre Wachstumsphase**

Stadium A: Präfollikuläre Phase des primären Wachstums: Die Oozyten liegen innerhalb eines Oozytennestes und alle Oozyten sind in der gleichen Phase der meiotischen Prophase. Die Chromosomen sind deutlich sichtbar.

Stadium B: Follikelphase des primären Wachstums: Die Oozyten sind aus dem Nest ausgewandert und besitzen jetzt einen Follikel. Die Kerne der Oozyten sind groß und enthalten viele randständige Nucleoli. Das Cytoplasma färbt sehr dunkel. Die Theca ist extrem dünn und erscheint meist nur als grüner Saum. Zwischen den Follikeln liegen Lymphräume und Blutgefäße. Das Cytoplasma ist weitgehend vakuolenfrei.

#### **Reifestufe II – Cortical-Alveolus Stadium**

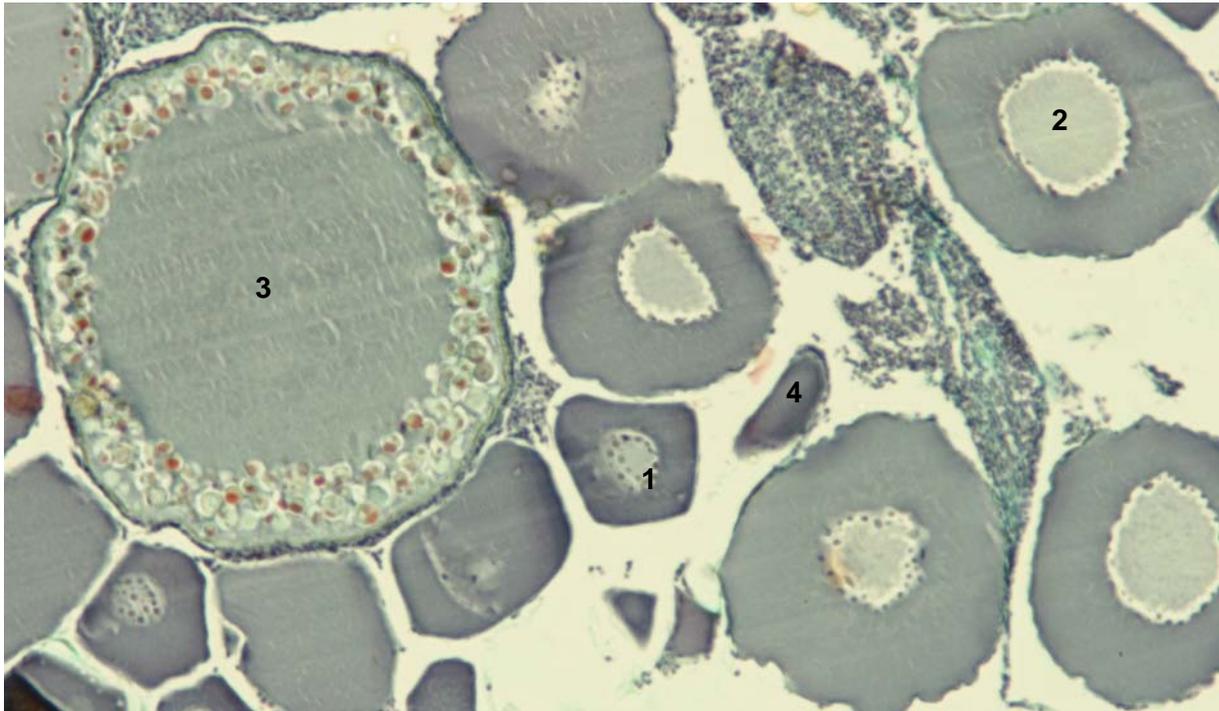
Die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des nur noch schwach färbenden Cytoplasmas verschoben. Im letzteren bilden sich zahlreiche corticale Alveoli, membranbegrenzte Vesikel unterschiedlicher Größe, die Proteine und Kohlenhydrate enthalten. Diese Corticalvesikel spielen bei der späteren Befruchtung des Eies, bei der sogenannten Corticalreaktion, eine Rolle. Vereinzelt treten in diesen Vesikeln auch rot angefärbte Granula auf. Die Zellen und Kerne der Granulosa sind größer, die Theca verdickt. Fibroblastenkerne und Faserbündel sind gut erkennbar. In diesem Stadium hat die Vitellogenese (Dotterbildung) noch nicht begonnen.

#### **Reifestufe III: Vitellogenese**

Das Cytoplasma erscheint jetzt lichtgrün-positiv mit sehr vielen Dottervakuolen, die zum Kern hin größer werden. Die Corticalvesikel sind vermehrt peripher angeordnet. Der Kern erscheint oft artifiziell geschrumpft, und die Anzahl der Nucleoli ist deutlich verringert. Am Ende dieser Phase bewegt sich der Kern von seiner zentralen Lage im Ooplasma weg.

### Reifestufe IV: Oozytenreifung

Der Oozytenkern wandert zur Peripherie der Oocyte und ist nur noch sehr schwer zu erkennen. An histologischen Schnitten ist es schwer, Follikel, die sich in der Vitellogenese befinden, von reifenden Stadien zu unterscheiden, da es keine strukturellen Marker gibt, die den Übergang kennzeichnen.



**Abb. 21:** Histologie des Ovars der Teleosteer am Beispiel des Weibchens Ulm 9 (1=frühe Reifestufe 1 mit zahlreichen braun färbenden Nucleoli, Cytoplasma sehr dunkel färbend, 2=späte Reifestufe 1 mit leichter Zunahme der Vakuolenbildung im Cytoplasma, Nucleoli randständig, 3=Reifestufe 2 mit stark entwickelter Vesikelbildung, Eihülle deutlich verdickt, Beginn der Vitellogenese, 4=atretischer Follikel) (160x, Goldner-Färbung)

## 8.3 Ergebnisse

159 Gonadenproben wurden im Institut für Zoologie der Universität Heidelberg histologisch untersucht. Die Ergebnisse der histologischen Analyse der männlichen Gonaden sind in Tab. 7 zusammengefasst. Proben, die im Gelände als männliche Gonaden klassifiziert wurden und dem Institut für Zoologie der Universität Heidelberg übergeben wurden, hier aber eindeutig als weibliche Gonaden definiert werden konnten, sind separat in Tab. 11 aufgeführt. Beide Tabellen sind wie folgt zu lesen:

*Geschlecht der untersuchten Individuen:*

- m** männlich (Hoden)
- w** weiblich (Ovar)

*Verbreitung von Mischgonaden (Hoden mit Eizellen):*

- fehlt
- (+)** schwach entwickelt
- ++** deutlich entwickelt

*Reifestadien der Hoden:*

- 0** völlig inaktiv
- 1** unreif (Reifegrad: fast ausschließlich Spermatogonien)
- 1-2** vereinzelt Spermatozyten (Beginn der Meiose)
- 2** regelmäßig Spermatozyten (neben Spermatogonien)
- 2-3** mehr Spermatozyten als Spermatogonien; nur sehr vereinzelt Spermatiden und reife Spermien
- 3** Spermatiden und reife Spermien regelmäßig nachweisbar
- 3-4** weitgehend unreif, aber in einzelnen Tubuli wenige Spermatiden und reife Spermien
- 4** reif

*Reifestadien der Ovarien:*

- 1** deutlich erkennbarer Nucleus mit zahlreichen braun färbenden Nucleoli. Cytoplasma sehr dunkel färbend. Die Theca ist nur als dünner grüner Saum zu erkennen
- 2** Zunahme der Vakuolenbildung im Cytoplasma (Beginn der Einlagerung von Dotter); im Nucleus sind immer noch deutlich die jetzt randständigen Nucleoli erkennbar (Perinukleolarstadium).
- 3** In diesem Stadium hat, erkennbar am Auftreten der Dottervakuolen, die Vitellogenese bereits begonnen. Peripher sind Cortikalvesikel angeordnet. Der Kern ist geschrumpft, die Nucleoli sind nicht mehr erkennbar

*Häufigkeitsverteilung der Reifestadien der Spermio- und Oogenese; Entwicklungsgrad des Bindegewebes zwischen den Tubuli des Hodens; Zahl der Fibrozyten im Bindegewebe zwischen den Tubuli des Hodens; Zahl der nekrotischen bzw. atretischen Entwicklungsstadien von Spermio- und Oogenese:*

- fehlend
- (+)** sehr selten
- +** selten
- ++** regelmäßig bis häufig
- +++** sehr häufig
- ++++** massenhaft

Tab. 7: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der männlichen Tiere

ID-PNF	Bez.	Fisch-Nr.	Sex	Mischgonade	Reifegrad Gonade	Spermatogonien	Spermatozyten	Spermatiden	Bindegewebe	Fibrozyten	Fibrose	nekrot. Zellen	Bemerkungen
2101	Güdingen	1	m	-	1	+++	+	-	+++	+++	++	+	Cysten
2101	Güdingen	2	m	-	1 - 2	++	++	(+)	++	+++	++	+	
2101	Güdingen	3	m	-	?	+	+	-	+++	+++	+++	+	viele Cysten
2101	Güdingen	4	m	-	4	-	+++	++++	+++	+++	++		
2101	Güdingen	5	m	-	1	+++	+	-	+++	+++	+++		
2101	Güdingen	6	m	-	4	-	+++	++++	+++	+++	+++		
2101	Güdingen	7	m	-	1	+++	+	-	+	-	(+)		
2101	Güdingen	9	m	-	1	++	+	-	++	++			
2101	Güdingen	10	m	-	1 - 2	++	++	-	+++	+++	+++		sehr viele Cysten
2101	Güdingen	11	m	-	1 - 2	++	++	-	+++	+++	+++		
2101	Güdingen	12	m	-	1	++	+	-	+	+		+	
2101	Güdingen	13	m	(+)	2 - 3	+	++	(+)	++	+++	+++		eine encystierte Eizelle?
2101	Güdingen	14	m	-	0 - 1	++	(+)	-	+++	+++	periph.		kleine Tubuli
2101	Güdingen	15	m	-	1	++	(+)	-	+++	++	++		kleine Cysten
2101	Güdingen	16	m	-	2 - 3	++	++	+	++	+	(+)		
2101	Güdingen	17	m	-	2 - 3	++	+	(+)	++	++	+		kleine Tubuli
2101	Güdingen	18	m	-	1 - 2	++	++	-	+	+			
2101	Güdingen	19	m	-	1 - 2	++	++	-	++	++	+		
2101	Güdingen	20	m	-	2 - 3	++	++	(+)	+++	++	+		
2111	Rehlingen	8	m	-	0	+++	-	-	++	+	+		
2111	Rehlingen	9	m	-	0 - 1	+++	+	-	+(++)	+	+		
2111	Rehlingen	12	m	-	0	+++	-	-	++	+	+		
2111	Rehlingen	15	m	-	0 - 1	+++	+	((+))	+++	++	fokal +		
2111	Rehlingen	19	m	-	0	++	-	-	+	+			
2111	Rehlingen	20	m	-	0	++	-	-	+++	++	++		
4201	Weil	1	m	-	2 (-3)	+++	++	(+)	+	+			
4201	Weil	3	m	-	2 (-3)	+++	++	(+)	++	++	(fokal +)		
4201	Weil	4	m	-	1 - 2	+++	++	-	++	+	+		
4201	Weil	5	m	-	2 (-3)	+++	++	(+)	++	+	fokal +		
4201	Weil	6	m	-	1 - 2	+++	++	-	++	+			unreif
4201	Weil	7	m	-	1 - 2	++	++	-	++	+			unreif
4201	Weil	9	m	-	1 - 2	++	++	-	++	+			unreif
4201	Weil	10	m	-	1 - 2	++	++	-	++	++	++		unreif, mäßige Fibrose
4201	Weil	11	m	-	2	++	+++	(+)	++	++	fokal ++		fokal leichte Fibrose
4201	Weil	12	m	-	1 - 2	++	++	-	++	++	fokal ++		fokal leichte Fibrose
4201	Weil	15	m	-	1 - 2	+++	++	-	++	+	+ - ++		
4301	Iffezheim	2	m	-	0	+++	-	-	++	+	(+)		
4301	Iffezheim	3	m	-	1	+++	+	-	+	+			
4301	Iffezheim	5	m	-	1	+++	+	-	+	+			
4301	Iffezheim	6	m	-	1	+++	+	-	+	+			
4301	Iffezheim	15	m	-	2	++	++	-	+	+			
4401	Koblenz	2	m	-	1	+++	+	-	+	+			
4401	Koblenz	3	m	-	1 - 2	++	++	-	+	+			
4401	Koblenz	5	m	-	1 - 2 (-3)	++	++	(+)	+	+			
4401	Koblenz	6	m	-	1	+++	+	-	+	+			
4401	Koblenz	12	m	-	1	+++	+	-	+	+			
4401	Koblenz	13	m	-	1	+++	+	-	+	+			

**Fortsetzung der Tabelle:**

ID-PNF	Bez.	Fisch-Nr.	Sex	Mischgonade	Reifegrad Gonade	Spermatogonien	Spermatozyten	Spermatiden	Bindegewebe	Fibrozyten	Fibrose	nekrot. Zellen	Bemerkungen
4501	Bimmen	2	m	-	2	++	+++	-	+	-			Tubuli sehr klein
4501	Bimmen	6	m	-	1-2	++	++	-	+	-			
4501	Bimmen	11	m	-	2	++	+++	-	+	-			Tubuli sehr klein
10110	Prossen	2	m	-	1-2	++	++	(+)	++	+			
10110	Prossen	3	m	-	1	+++	+	-	++	+			
10110	Prossen	4	m	-	1-2	++	++	(+)	++	(++)	+(++)		
10110	Prossen	5	m	-	2 (-3)	+++							
10110	Prossen	6	m	-	1	+++	+	-	++	(++)	fokal ++		
10110	Prossen	7	m	-	1	+++	(+)	-	++	+			
10110	Prossen	9	m	-	1	+++	+	-	+++	+++			
10110	Prossen	10	m	-	1	+++	(+)	-	++	+			
10110	Prossen	12	m	-	1-2	++	++	-	+	+			
10110	Prossen	13	m	-	1-2	++	++	-	+	+			
10110	Prossen	17	m	-	0	+++	-	-	+++	+++	+++		
10505	Zehren	1	m	-	1-2	++	++	-	++	++	++	+	
10505	Zehren	3	m	-	1-2	++	++	+	++	++	++	+	Tubuli klein
10505	Zehren	4	m	-	1-2	++	++	-	++	++	++	++	
10505	Zehren	13	m	-	1-2	++	++	-	++	+	+		Fremdzellen in Tubuli
10505	Zehren	15	m	-	1-2	+++	++	-	++	+	(+)		
10505	Zehren	17	m	-	0	+++	-	-	++	+	(fokal +)		
10505	Zehren	18	m	-	0	+++	-	-	++	+	(fokal +)		
10205	Barby	9	m	-	2-3	++	++	+	+	-			
10205	Barby	10	m	-	2-3	++	+++	+	+	-		(+)	
10205	Barby	11	m	-	2	++	+++	-	+	-			Tubuli sehr klein
10205	Barby	13	m	-	2	+++	+++	-	+	-			
10205	Barby	15	m	-	2	++	+++	-	+	-			
10205	Barby	16	m	-	0-1	++	+	-	+	-			
10205	Barby	17	m	-	2	++	+++	-	+	-			
10205	Barby	20	m	-	2	++	+++	-	++	-			
10305	Cumlosen	2	m	-	2	++	+++	-	+	-			Tubuli sehr klein
10305	Cumlosen	4	m	-	2-3	++	+++	+	+	-			
10305	Cumlosen	7	m	-	2	++	+++	-	+	-		+	
10305	Cumlosen	11	m	-	1-2	++	++	-	+	-			Tubuli sehr klein
10305	Cumlosen	15	m	-	0-1	+++	-	-	++	++	++		Tubuli klein
10305	Cumlosen	16	m	-	1-2	+++	++	-	+++	+++	++		
10305	Cumlosen	18	m	-	1-2	++	+	-	+++	+++	++		
10305	Cumlosen	20	m	-	3	++	++	++	++	++	+		
10405	Blankenese	2	m	-	2	+	+++	-	+	-			
10405	Blankenese	5	m	-	2-3	++	+++	+	++	+		+	
10405	Blankenese	7	m	-	2	+	+++	-	+	-			
10405	Blankenese	8	m	-	2	+	+++	-	+	-			
10405	Blankenese	9	m	-	2	+	+++	+	+	+			
10405	Blankenese	10	m	-	2	+	++	-	+	-			
10405	Blankenese	12	m		?				+	-			Fixierung schlecht
10405	Blankenese	13	m	-	2-3	+	+++	+	+	++		+	
10405	Blankenese	14	m	++	2	+	+++	-	+	+			Mischgonade!

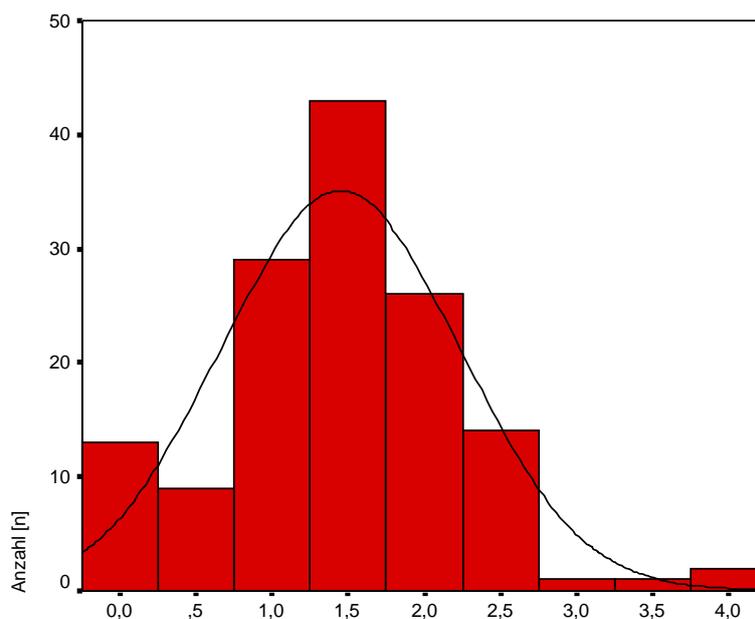
**Fortsetzung der Tabelle:**

ID-PNF	Bez.	Fisch-Nr.	Sex	Misch-gonade	Reifegrad Gonade	Sperma-togonien	Sperma-tozyten	Sperma-tiden	Binde-gewebe	Fibro-zyten	Fibrose	nekrot. Zellen	Bemer-kungen
10405	Blankenese	15	m	-	1	+	+	-	+	++			Tubuli sehr klein
10405	Blankenese	16	m	-	2	++	+++	-	+	+		+	
10405	Blankenese	17	m	-	2	++	+++	-	+	-		+	
10405	Blankenese	19	m	-	2	++	+++	-	+	+		+	
10405	Blankenese	20	m	-	2-3	+	+++	+	+	++		+	
11001	Saale	2	m	-	1-2	++	++	+	+++	++	fokal ++		
11001	Saale	4	m	-	1-2	++	++	-	+++	+++	fokal ++	fokal ++	
11001	Saale	5	m	-	0	(+)	(+)	-	+++	+++	fokal ++	fokal ++	
11001	Saale	7	m	-	1-2	++	++	-	++	++			Kolloid im Lumen
11001	Saale	9	m	-	1-2	++	++	-	+++	+++	+++		
11001	Saale	10	m	-	1-2	++	++	-	+++	++		+	Vakuolenbildung
11001	Saale	16	m	-	?	?	-	-	+++	+++	+++	+++	
11001	Saale	19	m	-	0	++	-	-	++	++	+++	+	
11002	Mulde	5	m	-	?	?	-	-	+++	+++	+++		inaktiv
11002	Mulde	8	m	-	1	+++	+	-	++	+	+		
11002	Mulde	9	m	-	1-2	++	++	-	+	+	+		
11002	Mulde	10	m	-	1	+++	(+)	-	+++	+++	+++		
11002	Mulde	11	m	-	1	+++	+	-	++	(++)	fokal ++		
11002	Mulde	15	m	-	1-2	++	++	-	+	+	+		
11002	Mulde	20	m	-	1	+++	+	-	++	(++)	fokal ++		
17101	Ulm	1	m	-	1-2	++	++	-	+++	++	++	+	
17101	Ulm	2	m	-	1-2	++	++	-	+++	++	++		
17101	Ulm	3	m	-	0-1	+++	+	-	++	+			
17101	Ulm	5	m	-	0-1	+++	+	-	+++	++	++		
17101	Ulm	7	m	-	0-1	+++	+	-	+	+			
17101	Ulm	10	m	-	1	+++	+	-	+	+			
17101	Ulm	11	m	-	1	+++	+	-	+	+			
17101	Ulm	12	m	-	0	+++	-	-	++	++	++		
17101	Ulm	13	m	-	1-2	++	++	(+)	++	++	++		fibrotisch
17101	Ulm	14	m	-	0	(+)	-	-	++++	?	++++	++	nur periphere Spermatog.
17101	Ulm	17	m	-	1	+++	(+)	-	++	+			
17201	Kelheim	1	m	-	2	+++	++	-	++	+			
17201	Kelheim	3	m	-	2	+++	++	-	++	+			
17201	Kelheim	4	m	-	?	(+)	(+)	-	+++	++	++		
17201	Kelheim	6	m	-	0	+++	+	-	+	+			
17201	Kelheim	7	m	-	1-3	+++	+	(+)	+	+		(+)	
17201	Kelheim	8	m	-	1-2	+++	++	-	++	+			
17201	Kelheim	10	m	-	1-2	+++	+	-	+	+			
17201	Kelheim	12	m	-	1-2	++	++	-	+	+			
17201	Kelheim	13	m	-	0-1	+++	+	-	+	+			
17201	Kelheim	16	m	-	1	+++	+	-	+	+			
17201	Kelheim	17	m	-	1	++	++	-	+	+			
17201	Kelheim	19	m	-	2(-3)	++	++	(+)	+++	++	++		
17201	Kelheim	20	m	-	2-3	++	+++	+	+	+			

**Fortsetzung der Tabelle:**

ID-PNF	Bez.	Fisch-Nr.	Sex	Mischgonade	Reifegrad Gonade	Spermatogonien	Spermatozyten	Spermatiden	Bindegewebe	Fibrozyten	Fibrose	nekrot. Zellen	Bemerkungen
17301	Jochenst.	3	m	-	1 - 2	++	++	-	+	+			
17301	Jochenst.	4	m	-	1 - 2	++	++	-	+	+		(+)	
17301	Jochenst.	6	m	-	1 - 2	++	++	-	+	+			
17301	Jochenst.	7	m	-	1 - 2	++	++	-	++	+	(+)		
17301	Jochenst.	9	m	-	1 - 2	++	++	-	++	+	+		
17301	Jochenst.	13	m	-	2 (- 3)	+++	++	(+)	+	+			
17301	Jochenst.	17	m	-	3 - 4	++	++	+++	++	+			
17301	Jochenst.	19	m	-	1 - 2	++	++	-	+	+			

Wie aus Tab. 7 ersichtlich wird, wurde in einem ersten Schritt der Reifezustand der Gonaden über alle untersuchten Probenahme­flächen dokumentiert. In Folge der sommerlichen Probenahme unmittelbar nach Abschluss des Laichgeschäftes erwiesen sich die untersuchten Proben mit wenigen Ausnahmen als sehr unreif oder gar inaktiv. Reife Spermien konnten nur bei einem Tier, Spermatiden bei nur wenigen Individuen diagnostiziert werden. Da der Reifegrad der Gonaden als Marker für den physiologischen Zustand der Tiere interpretiert werden kann, ist ein Rückschluss hinsichtlich der Eignung der ausgewählten Probenahmeterminale möglich. Der geringe Reifegrad bestätigt somit den Anspruch, die Tiere während eines physiologisch stabilen Zustandes zu beproben (vgl. Abb. 22).



**Abb. 22:** Reifestufen männlicher Gonaden (n=145) (0 = völlig inaktiv, 1 = unreif, 2 = regelmäßige Spermatozyten, 3 = Spermatiden, 4 = reif)

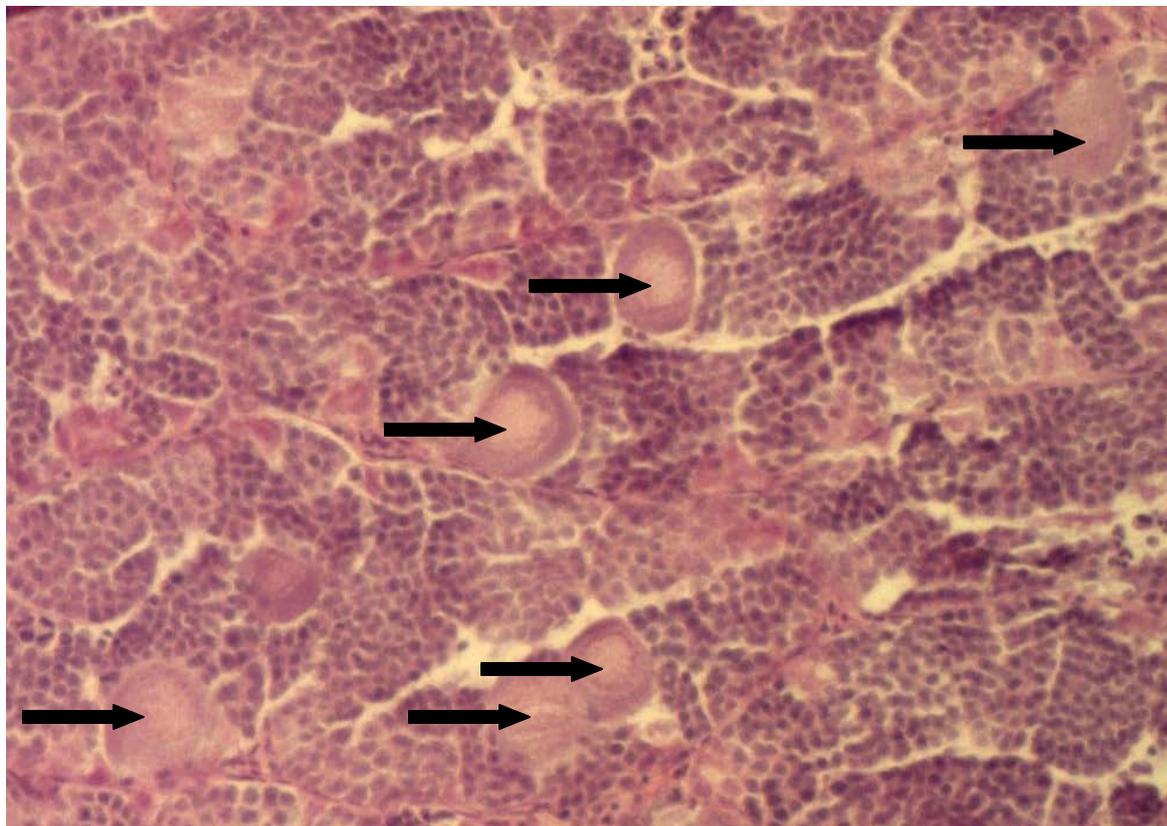
Der leicht erhöhte Reifegrad der Gonaden der Tiere von Blankenese deutet allerdings an, dass bereits im Herbst eine physiologisch aktivere Phase bereits wieder begonnen hat (Tab. 8; vgl. HECKER 2001). In Kombination mit den entsprechenden Ergebnissen des Vtg-Assay an den weiblichen Individuen dieses Standortes lässt dies den Schluss zu, dass der Probenahmezeitpunkt tendenziell zu spät gewählt wurde (vgl. Kap. 7.3). Um den physiologischen Zustand der Proben vergleichbar zu halten, sollte die Brassens-Probenahme in Blankenese deshalb früher im Jahr, ebenfalls im August, erfolgen.

**Tab. 8: Durchschnittlicher Reifegrad der Gonaden der männlichen und weiblichen Tiere der untersuchten Probenahmeflächen (sortiert nach Probenahmeterminen)**

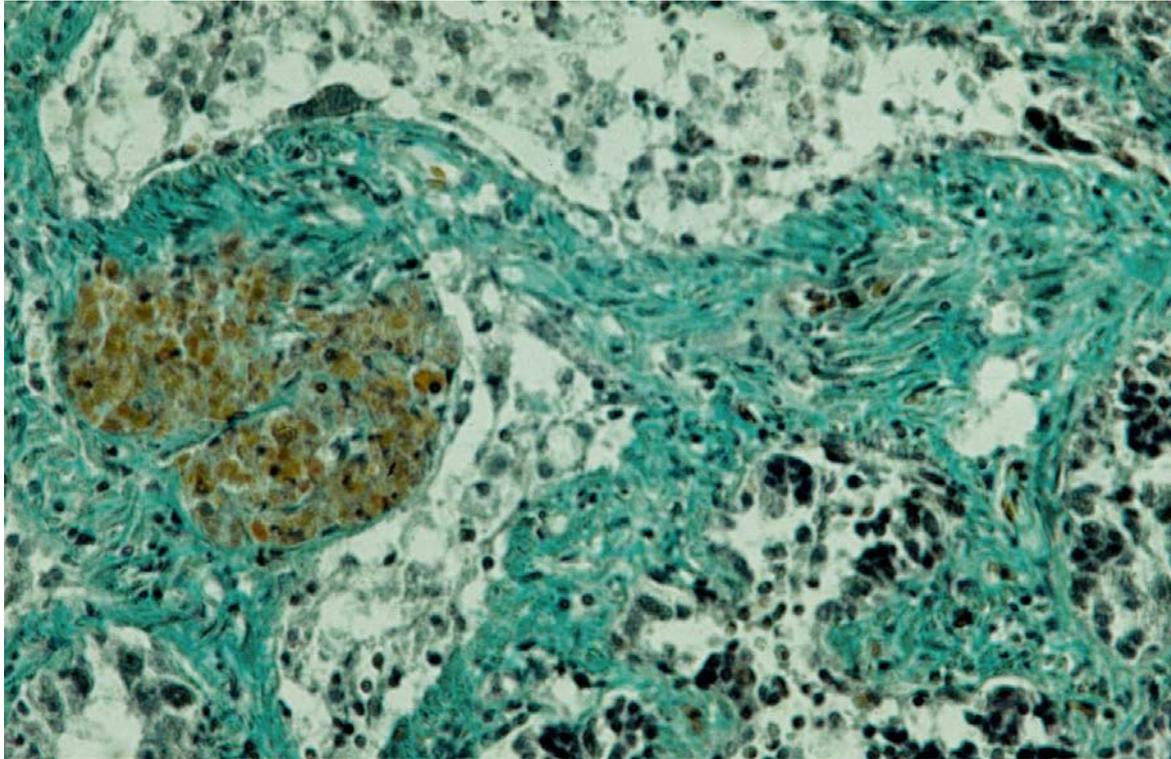
ID-PNF	PNF	n (m)	Ø Reifegrad (m)	n (w)	Ø Reifegrad (w)	n (ges)	Ø Reifegrad (gesamt)	PN-Termin
2111	Rehlingen	6	0,17	-	-	6	0,17	14.-15.07.2002
2101	Güdingen	18	1,74	-	-	18	1,74	18.-19.07.2002
17101	Ulm	11	0,82	2	2,00	13	1,00	21.-23.07.2002
17301	Jochenstein	8	1,81	-	-	8	1,81	23.-24.07.2002
17201	Kelheim	12	1,46	-	-	12	1,46	24.-25.07.2002
4401	Koblenz	6	1,25	4	1,50	10	1,35	27.-28.07.2002
4301	Iffezheim	5	1,00	-	-	5	1,00	29.-30.07.2002
4201	Weil	11	1,82	-	-	11	1,82	30.-31.07.2002
4501	Bimmen	3	1,83	1	2,00	4	1,88	31.07.-02.08.2002
10110	Prossen	11	1,23	1	2,00	12	1,29	05.-06.08.2002
10505	Zehren	7	1,07	1	3,00	8	1,31	06.-07.08.2002
11001	Saale	7	1,07	-	-	7	1,07	08.-09.08.2002
11002	Mulde	6	1,17	-	-	6	1,17	09.-10.08.2002
10305	Cumlosen	7	1,81	2	1,50	9	1,78	12.08.2002
10205	Barby	8	1,94	2	1,50	10	1,85	13.08.2002
10405	Blankenese	13	2,04	2	1,75	15	2,00	17.-19.09.2002

Hinsichtlich des Untersuchungsschwerpunktes der Überprüfung endokriner Wirkung kann festgehalten werden, dass sich an den untersuchten Probenahmeflächen kaum Hinweise auf Einflüsse endokrin wirksamer Substanzen ergeben. Bemerkenswert sind lediglich zwei Individuen: In Individuum Blankenese 14 konnte eine ausgeprägte Mischgonade (vgl. Abb. 23) diagnostiziert werden. In den Gonaden dieses Tieres wurden neben Spermatozyten unterschiedlichen Reifegrades vereinzelt auch Eizellen nachgewiesen. Nicht ganz sicher ist die Diagnose einer einzelnen encystierten Eizellen im Hoden von Tier Güdingen 13, da die Strukturen zu selten auftraten (vgl. Abb. 24). Inwiefern dieses Phänomen auf endokrin wirksame Substanzen zurückzuführen ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden.

In der Gesamtbetrachtung aller untersuchten 145 männlichen Gonaden ist hinsichtlich morphologischer Gewebeveränderungen lediglich bei diesen beiden Individuen ein Einfluss endokrin wirksamer Substanzen anzunehmen.



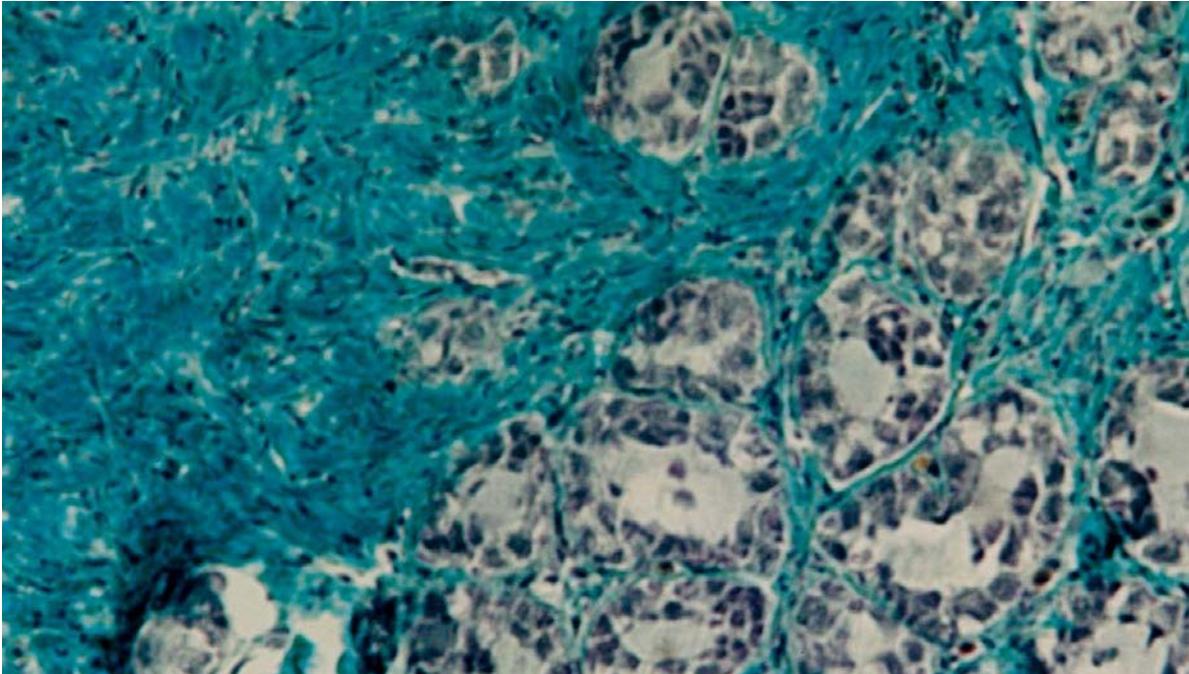
**Abb. 23:** Mischgonade in Tier 14 der Probenahme­fläche Blankenese (250x, H&E-Färbung), Oozyten sind mit Pfeilen gekennzeichnet



**Abb. 24: Encystierte Eizelle in Tier 13 der Probenahme­fläche G üdingen (250x, Goldner-Färbung)**

Wie durch die ausgeprägte Grünfärbung in Abb. 24 bereits deutlich wird, wurde in den Gonaden einiger Tiere der Probenahme­fläche G üdingen zum Teil extrem entwickeltes Bindegewebe nachgewiesen. Die Entwicklung des Bindegewebes zwischen den Tubuli ist zwar individuell sehr verschieden, aber im Vergleich zu den Tieren der übrigen Probenahme­flächen deutlich verstärkt. Einige Individuen weisen in starkem Maße zystenartige Erweiterungen des Bindegewebes mit einem hyalinen Inhalt auf. Zwischen den stark erweiterten, mit zahlreichen Spermatisden und Spermien angefüllten Tubuli sind kräftige Stränge von Bindegewebe zu erkennen, die sich an manchen Stellen zu zystenartigen Gebilden mit einem amorphen Inhalt erweitern (vgl. Abb. 25). Inwiefern dieses als Fibrose definiertes Phänomen als pathologisches Merkmal zu deuten ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt werden. Aufgrund der starken Ausprägung ist allerdings von einer eingeschränkten Funktionalität der Gonade auszugehen. Der oder die Auslöser einer solchen Fibrose sind nicht einfach zu beschreiben. Aus Laborversuchen ist bekannt, dass fibrotische Erscheinungen in der Leber sowohl durch Schwermetalle, wie Cadmium und Quecksilber, aber auch durch Ethanol etc. induziert werden können. Nähere Informationen zu auslösenden Agenzien von Fibrosen in Gonadengewebe liegen nicht vor. Erschwert wird diese Betrachtung außerdem dadurch, dass die Häufigkeit der pathologischen Merkmale, wie ausgeprägte Fibrosen und nekrotische Zellen; sowohl

aufgrund einer großen individuellen Variabilität innerhalb der Standorte stark schwankt, als auch in seiner Ausprägung zwischen den Standorten stark variiert.



**Abb. 25: Verstärkte Bindegewebsausprägung und Fibrose (grün-blau) in Tier 14 der Probenahme­fläche Güdingen (250x, Goldner-Färbung)**

Wie aus Tab. 7 hervorgeht, sind fibrotische Erscheinungen insbesondere bei den Individuen der Saar sowie der Elbe und ihrer Nebenflüsse ausgeprägt. Bei Betrachtung des prozentualen Anteils fibrotischer Gewebe bzw. des Fibrosegrades bezogen auf den maximal möglichen Anteil an der Gesamtstichprobe einer Probenahme­fläche wird deutlich, dass die Fibrose insbesondere in den Tieren von Mulde (Dessau) und Saale (Wettin) eine starke Ausprägung erfährt (vgl. Abb. 26). Berücksichtigt wurde hier die Ausprägung der Fibrose bezogen auf alle untersuchten Individuen. In Tab. 9 sind zur weiteren Erläuterung die prozentuale Zuordnung der Individuen zu den Fibroseklassen aufgeführt. Hieraus wird deutlich, dass neben den genannten Probenahme­flächen Güdingen, Mulde (Dessau) und Saale (Wettin) auch die Tiere von Prossen in einer hohen Schadklasse einzugruppieren sind. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund bedeutsam, dass aufgrund der Häufigkeit des Auftretens der Fibrose und dem fortgeschrittenen Grad ihrer Ausprägung wegen zunehmender Inaktivierung der Gonade eine Beeinträchtigung der Reproduktion in diesen Populationen angenommen werden kann.

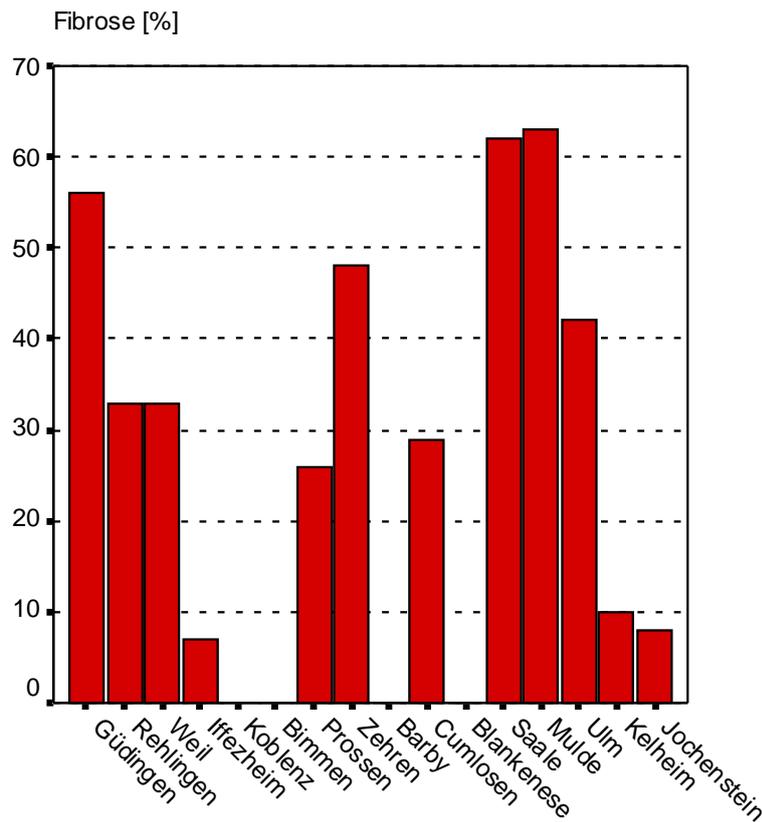
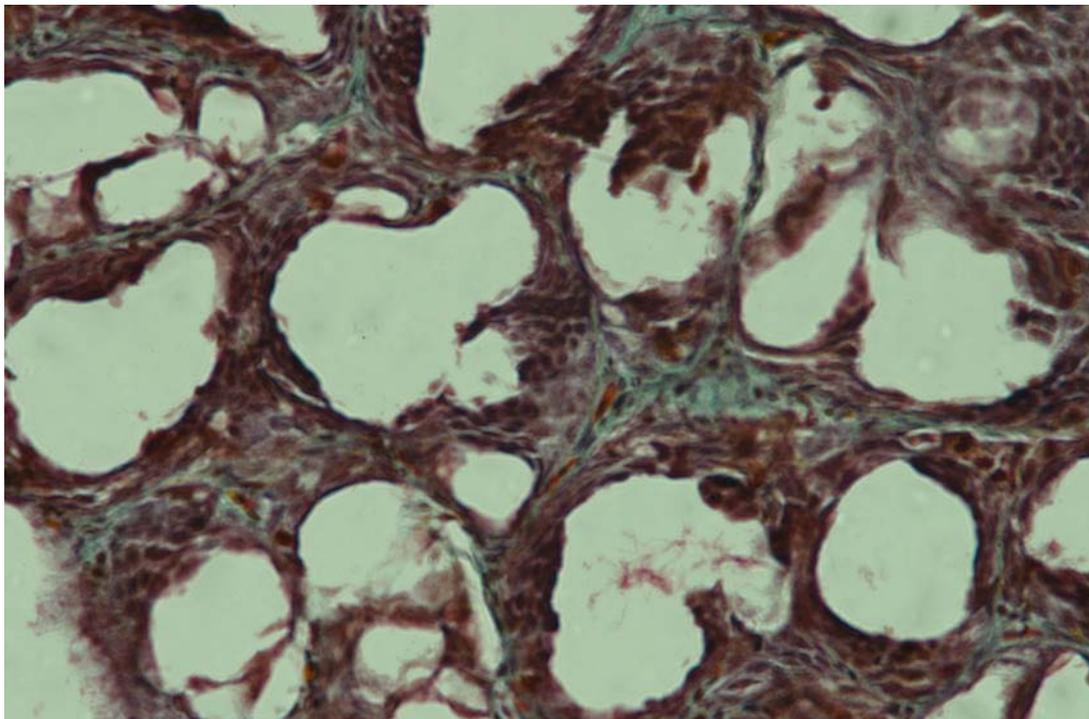


Abb. 26: Prozentualer Anteil des Fibrosegrades [%] innerhalb der Gesamtstichprobe einer Probenahme­fläche

Tab. 9: Prozentualer Anteil der Fibroseklassen (0=fehlend bis 4=massenhaft) an der Gesamtstichprobe einer Probenahme­fläche (gerundet) sowie prozentualer Anteil als fibrotisch charakterisierter Individuen

	n	0	1	2	3	4	Symptome
Güdingen	19	16	32	21	32	0	85
Rehlingen	6	17	67	17	0	0	84
Weil	11	36	27	36	0	0	63
Iffezheim	5	80	20	0	0	0	20
Koblenz	5	100	0	0	0	0	0
Bimmen	3	100	0	0	0	0	0
Prossen	9	67	0	22	11	0	33
Zehren	7	0	57	43	0	0	100
Barby	8	100	0	0	0	0	0
Cumlosen	8	50	13	38	0	0	51
Blankenese	13	100	0	0	0	0	0
Mulde	7	0	43	29	29	0	100
Saale	8	25	0	38	38	0	76
Ulm	9	44	0	44	0	11	55
Kelheim	13	85	0	15	0	0	15
Jochenstein	8	75	25	0	0	0	25

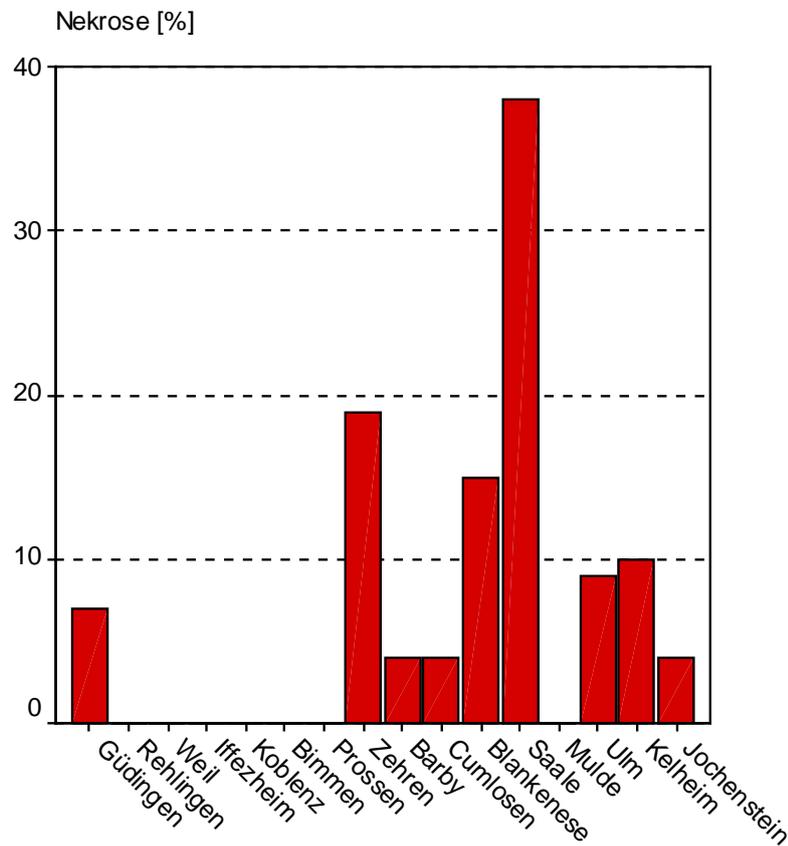
Ebenso konnten in einigen Individuen nekrotische Areale sowie eine Vakuolisierung von Spermatogonien festgestellt werden (vgl. Tab. 7). Die starke Vakuolisierung zahlreicher Spermatogonien dürfte in diesem Zusammenhang als Vorstufe nekrotischer Veränderungen der Hodentubuli zu interpretieren sein. Die Nekrose ist zwar ein selteneres Phänomen als die oben beschriebene Fibrose, aber je nach Ausprägung vermag sie wesentlichen Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit eines Tieres bzw. der Gesamtpopulation auszuüben. Insbesondere bei stark ausgeprägter Nekrose wiesen die Tubuli ein stark degeneriertes Epithel auf. Typische Entwicklungsstadien der Spermatogenese konnten in diesen Fällen nicht mehr identifiziert werden. Wie in Abb. 27 ersichtlich wird, ist bei einem solchen Hoden nicht mehr von einer Reproduktionsfähigkeit des Organismus auszugehen. Die Ursachen einer solch ausgeprägten Nekrose sind allerdings vielschichtig und können nicht unbedingt mit endokriner Wirkung in Zusammenhang gebracht werden.



**Abb. 27: Nekrotische Tubuli in Tier 4 der Probenahmefläche Kelheim (250x, Goldner-Färbung)**

In Abb. 28 ist die Ausprägung der Nekrose in den Fischgonaden der einzelnen Probenahme-flächen dargestellt. Hier wird deutlich, dass die nekrotischen Erscheinungen insbesondere in der Saale ausgeprägt zu sein scheinen (63% der untersuchten Individuen nekrotisch). Die Darstellung der prozentualen Ausprägung der Nekrose bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Individuen macht deutlich, dass insbesondere die Tiere der Saale, sowie auch die Tiere von Zehren und Blankenese nekrotisches Gewebe aufwiesen (vgl. Abb. 28). In

Tab. 10 sind zur weiteren Erläuterung die prozentuale Zuordnung der Individuen zu den Nekroseklassen aufgeführt. Hieraus wird deutlich, dass neben den genannten Probenahme-  
flächen auch in Ulm und Kelheim zum Teil stark nekrotische Tiere gefunden wurden.



**Abb. 28:** Prozentualer Anteil des Nekrosegrades [%] innerhalb der Gesamtstichprobe einer Probenahme-  
fläche

Alles in allem kann zusammengefasst werden, dass mit zwei Ausnahmen keine endokrinen Wirkungen in der Struktur der untersuchten männlichen Gonaden nachgewiesen werden konnte. Die Vielzahl fibrotischer und nekrotischer Erscheinungen lässt jedoch Rückschlüsse dahingehend zu, dass insbesondere die Tiere der Probenahme-  
flächen Gündingen, Rehlingen, Saale und Mulde einer allgemeinen Belastung durch Umweltchemikalien ausgesetzt sind, die pathologische Wirkungen nach sich zieht.

**Tab. 10: Prozentualer Anteil der Nekroseklassen (0=fehlend bis 3=sehr häufig) an der Gesamtstichprobe einer Probenahme­fläche (gerundet) sowie prozentualer Anteil als nekrotisch charakterisierter Individuen**

	n	0	1	2	3	Symptome
<b>Güdingen</b>	19	79	21	0	0	21
<b>Rehlingen</b>	6	100	0	0	0	0
<b>Weil</b>	11	100	0	0	0	0
<b>Iffezheim</b>	5	100	0	0	0	0
<b>Koblenz</b>	5	100	0	0	0	0
<b>Bimmen</b>	3	100	0	0	0	0
<b>Prossen</b>	9	100	0	0	0	0
<b>Zehren</b>	7	57	29	14	0	43
<b>Barby</b>	8	88	12	0	0	12
<b>Cumlosen</b>	8	88	12	0	0	12
<b>Blankenese</b>	13	54	46	0	0	46
<b>Mulde</b>	7	100	0	0	0	0
<b>Saale</b>	8	38	25	25	13	63
<b>Ulm</b>	9	78	11	11	0	22
<b>Kelheim</b>	13	85	8	0	8	16
<b>Jochenstein</b>	8	88	12	0	0	12

Bei der Betrachtung der histologischen Schnitte konnten 14 makroskopisch fälschlicherweise als männliche Tiere angesprochene Individuen dem weiblichen Geschlecht zugeordnet werden. Da das primäre Ziel der Untersuchung in der Überprüfung von Einflüssen endokriner Substanzen bestand, wurden die weiblichen Proben lediglich hinsichtlich ihres Reifegrades und der Qualität der Oozyten beurteilt (vgl. Tab. 11). Die Ovarien der zusätzlich untersuchten weiblichen Individuen waren ebenfalls erwartungsgemäß überwiegend unreif. Im Gegensatz zu den untersuchten Hoden konnte kein verstärkt ausgeprägtes Bindegewebe in der Theka nachgewiesen werden. Bemerkenswert war lediglich der Nachweis vereinzelt auftretender atretischer Follikel (vgl. Abb. 29). Atretische Follikel entstehen aus sekundären oder reifen anovulatorischen Follikeln. Es handelt sich hierbei allerdings nicht um einen Hinweis auf Belastung, sondern das Vorhandensein atretischer Follikel ist – sofern sie nicht gehäuft auftreten – ein gewöhnliches Phänomen. Aufgrund der Tatsache, dass mit Abschluss des Laichgeschäftes sowohl fruchtbare Eier als auch atretische Eier aus dem Ovar herausgelassen wurden, konnte bei der Analyse der Ovarien dieses Phänomen nur sehr selten nachgewiesen werden.

Tab. 11: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der weiblichen Tiere

ID-PNF	Bez.	Fisch-Nr.	Sex	Misch-gonade	Reifegrad Gonade	Spermatogonien	Spermatozyten	Spermatiden	Binde-gewebe	Fibro-zyten	Fibrose	nekrot. Zellen	Bemerkungen
4401	Koblenz	7	w	-	1 - 2								
4401	Koblenz	11	w	-	1 - 2								
4401	Koblenz	14	w	-	1 - 2								
4401	Koblenz	19	w	-	1 - 2								einzelne atretische Eier
4501	Bimmen	15	w	-	1 - 3								
10110	Prossen	19	w	-	1 - 2 (3)								
10505	Zehren	9	w	-	3								
10205	Barby	14	w	-	1 - 2								
10205	Barby	19	w	-	1 - 2								
10305	Cumlosen	12	w	-	1 - 2								
10405	Blankenese	6	w	-	1 - 2								
10405	Blankenese	18	w	-	1 (3)								
17101	Ulm	4	w	-	1 - 2 (3)								
17101	Ulm	9	w	-	1 - 2 (3)								z.T. atretische Eier

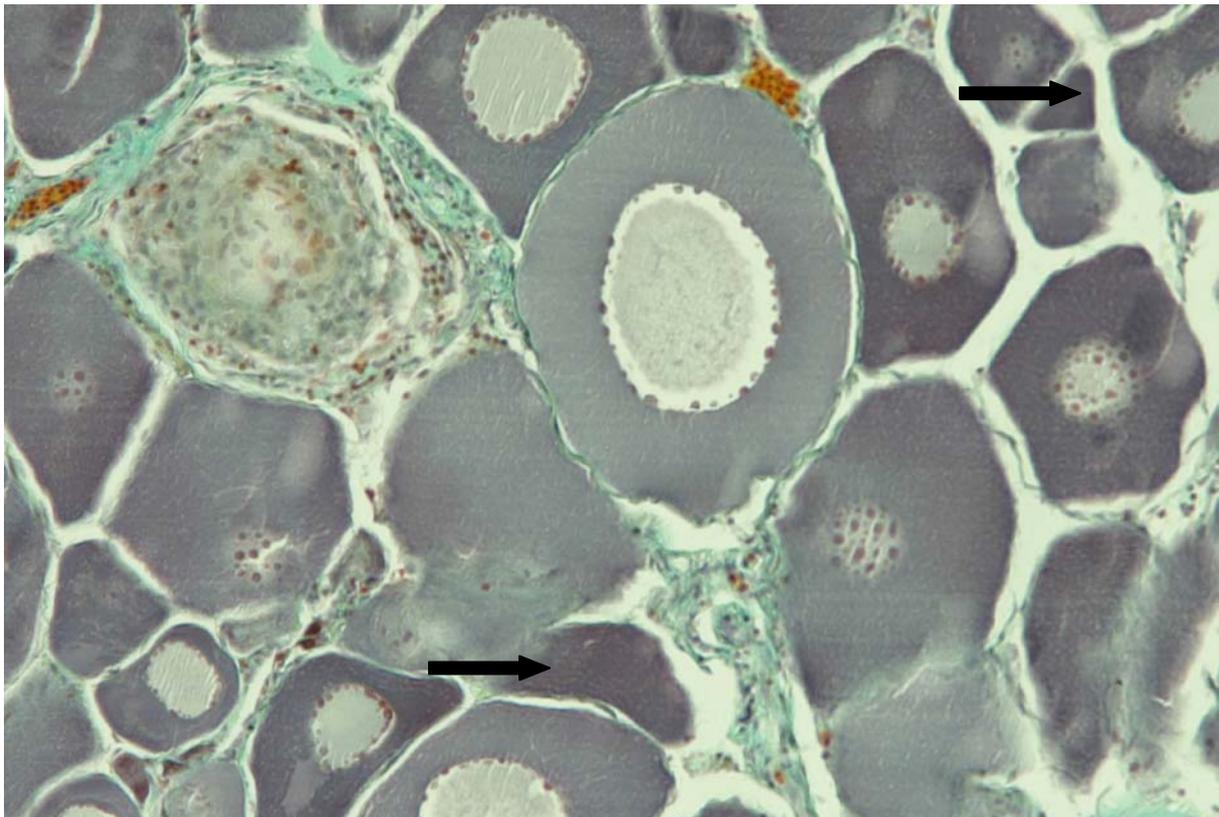


Abb. 29: Individuum 19 (weiblich) der Probenahme fläche Koblenz mit vereinzelt auftretenden atretischen Eiern (links oben = Zyste) (160x, Goldner-Färbung)

## 9 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse der Vtg-Analysen und der histologischen Untersuchung

Die Vtg-Analysen zeigen zum einen, dass an den meisten Probenahme­flächen keine Hinweise auf die Anwesenheit endokrin wirksamer Substanzen in für Organismen relevanten Konzentrationen vorliegen. Das gilt für alle Probenahme­flächen im Rhein, in der Elbe, der Saale und der Donau. Die sowohl in Cumlosen als auch in der Donau bei Kelheim und Jochenstein erhöhten Gehalte weniger Individuen sollten vorsichtig interpretiert bzw. in weiteren Untersuchungen überprüft werden, bevor eindeutige Aussagen getroffen werden können. Zum anderen wird deutlich, dass in der Saar an beiden untersuchten Probenahme­flächen und in der Mulde unterhalb Dessau die Brassen gegenüber endokrin wirksamen Stoffen exponiert sind und diese Stoffe aufnehmen (Bioverfügbarkeit). Die Untersuchungen im Jahr 2001 bestätigen diese Aussage zumindest für die beiden Saarstandorte (BARTEL et al. 2002).

Im Vergleich dazu konnten durch die histologischen Untersuchungen der männlichen Gonaden keine Hinweise auf endokrine Wirkungen erhalten werden. Daraus lässt sich schließen, dass an allen Probenahme­flächen endokrin wirksame Substanzen wahrscheinlich keine nachteiligen Wirkungen in Brassen verursachen. Das bedeutet für den Vergleich der beiden Biomarker, dass Vtg zwar der sensiblere Marker zu sein scheint, der bereits die Anwesenheit und Bioverfügbarkeit relativ geringer Konzentrationen östrogen wirksamer Substanzen anzeigt, aber keine weitergehenden Informationen in Bezug auf reproduktive Störungen liefert. Zwar sind auch Ovotestis bei Fischen kein eindeutiger Nachweis dafür, aber die Tatsache nur einer nachgewiesenen Mischgonade macht deutlich, dass die Gefahr östrogen­er Wirkungen in deutschen Gewässern gering zu sein scheint.

Darüber hinaus kann auch nicht umfassend beantwortet werden, inwiefern das Auftreten von Eizellen in männlichen Gonaden bzw. eine Mischgonade ein natürliches Phänomen darstellen kann. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass nach Angaben von VOM SAAL et al. (1992) bei Fischen als primitive Vertreter der Vertebraten echter Hermaphroditismus bekannt ist. Hier können gleichzeitig funktionsfähige weibliche und männliche Gonaden vorhanden sein und damit die Fähigkeit zu befruchten und befruchtet zu werden (KLEIN 2003). Speziell zum Brassen liegen in diesem Zusammenhang allerdings keine Daten hinsichtlich des Vorkommens von Hermaphroditen vor (BRAUNBECK, mündl. Mitteilung).

An allen untersuchten Standorten wiesen die Fische mehr oder minder starke Anzeichen einer Fibrose auf. Am auffälligsten waren in diesem Zusammenhang die Standorte

Güdingen, Mulde (Dessau) und Saale (Wettin). Bei einzelnen Individuen kommen nekrotische Veränderungen der Gonaden hinzu, die allerdings nur im Zusammenhang mit einer allgemeinen Belastung der Tiere durch Umweltchemikalien interpretiert werden können. Die Ursachen dieser Phänomene sind allerdings sicherlich vielschichtig, weswegen diese Schadbilder keinesfalls als Hinweis auf spezifisch endokrine Wirkung interpretiert werden dürfen.

## **10 Zusammenfassung und Empfehlungen für die Probenahme**

Die Proben der Umweltprobenbank des Bundes werden zur Zeit, entsprechend dem klassischen Ansatz umwelttoxikologischer Untersuchungen, lediglich auf Konzentrationen chemischer Stoffe untersucht, wodurch Aussagen zur Exposition und Bioverfügbarkeit, aber nicht zur Wirkung möglich sind. Die Frage nach der Kausalität (Ursache-Wirkung) bleibt dadurch letztendlich genauso unbeantwortet wie diejenige nach der Relevanz bioverfügbarer Stoffe für Lebewesen. Aus diesem Grund wurden am Beispiel des Brassens im Rahmen der vorliegenden Untersuchung von der Auswahl geeigneter Zielkompartimente über die Erarbeitung und Beschreibung der methodischen Vorgehensweise bis zum beispielhaften Einsatz eines ausgewählten Markers Grundlagen für wirkungsorientierte Umweltbeobachtung anhand von Lagerproben der Umweltprobenbank des Bundes geschaffen.

Retrospektive Wirkungsuntersuchungen sind aufgrund der Vielschichtigkeit immunologischer, hormoneller und genetischer Systeme und der zum jetzigen Zeitpunkt geringen Kenntnis geeigneter Markersysteme für die UPB von entscheidender Bedeutung. Ziel der UPB muss in diesem Zusammenhang sein, als Grundlage für alle diese sich zunehmend entwickelnden Analyseverfahren eine qualitativ hochwertige, veränderungsfrei gelagerte Probe zur Verfügung stellen zu können.

Beispielhaft wurden Voruntersuchungen durchgeführt, die die methodische Vorgehensweise zur Probenahme und Probenlagerung von ausgewählten Körperkompartimenten des Brassens beleuchten sollten. Zu Beginn der vorliegenden Untersuchung wurden Blutplasma, als wichtigstes körpereigenes Transportmedium, und die Milz, als Vertreter von Gewebeproben, ausgewählt. Beide Kompartimente wurden im Rahmen der Routineprobenahmen und Screenings des Jahres 2002 in Saar, Rhein, Elbe, Mulde, Saale bzw. der Donau beprobt.

Hinsichtlich des Blutplasmas wurden umfangreiche Tests zur Betäubung des Fisches, zur Blutentnahme, zum Zusatz notwendiger Zusatzstoffe und zur weiteren Probenbehandlung durchgeführt. Daran anschließend wurde am Beispiel von Vitellogenin (Vtg-ELISA) die Qualität der nach der erarbeiteten Methode gewonnenen Routine- und Screeningproben beleuchtet. Aufgrund der vergleichsweise einfachen und schnellen Probenahme in Kombination mit dem hohen Informationsgehalt wird die Aufnahme von Blutplasma in das Konzept der UPB als Einzelprobe für retrospektive wirkungsorientierte Untersuchungen empfohlen.

Dementsprechend schließen sich die Empfehlungen zur Aufnahme der Identifikation für Blutplasma (ID 3131) in das Schlüsselsystem der UPB sowie die Empfehlung zur Fortschreibung der Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassens – wie in Anhang II dargelegt – an. Letzteres bezieht sich insbesondere auf Ergänzungen hinsichtlich der Probenahmetechnik: Betäubung des Fisches mittels elektrischer Durchströmung, Ergänzung hinsichtlich der Liste erforderlichen Materials sowie die methodische Beschreibung der Gewinnung einer qualitativ hochwertigen Blutplasmaprobe.

Für die erstmalige Aufnahme von Blutplasma als Einzelprobe wird aus Praktikabilitätsgründen die Erstellung von maximal zehn Aliquoten präferiert. Zur Gewinnung von ca. 100-200 µl Blutplasma pro Aliquot ist in diesem Fall die Entnahme von etwa 4 ml Vollblut pro Fisch erforderlich. Beide Werte stellen sowohl in der praktischen Vorgehensweise bei der Probenahme als auch hinsichtlich der Lagerkapazität umsetzbare Kapazitäten dar. Im Rahmen der geleisteten Arbeiten wurden von 20 Fischen jeder Probenahmefläche jeweils zehn Aliquote separat abgepackt und ins UPB-Cryolager der IME Schmallenberg überführt.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte ebenfalls deutlich gemacht werden, mit welcher methodischen Vorgehensweise Gewebe- bzw. Organproben als Zielkompartiment im Sinne einer lagerfähigen Einzelprobe in der UPB genutzt werden können. Diese Vorgehensweise wurde am Beispiel der Milz erarbeitet, ist aber auch ohne wesentliche Änderungen auf andere Organe, wie beispielsweise die Leber, zu übertragen. Dies gilt ebenso für den im Anschluss an die Voruntersuchungen erarbeitete Entwurf zur Ergänzung der aktuellen Probenahmerichtlinie. Zur Aufnahme von Gewebeproben als Lagerproben für retrospektive Wirkungsuntersuchungen besteht allerdings weiterer Forschungsbedarf: So wurden im Rahmen der Untersuchung die Gewebeproben als Ganzes eingefroren. Es konnten keine Empfehlungen zur sinnvollen Aliquotierung ausgesprochen werden. Im Rahmen einer weiterführenden Untersuchung müsste eine Validierung der aliquotierten Proben hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit und Repräsentativität durchgeführt werden. Für weiterführende Analysen liegen zum jetzigen Zeitpunkt 313 Milzproben der Routineprobenahmen und Screenings 2002 im Zwischenlager der Universität Trier vor. Erst nach Interpretation der daraus zu gewinnenden Ergebnisse kann entschieden werden, ob dieser Arbeitsschritt zur Aufnahme in das Konzept empfohlen werden kann.

Zur Schaffung einer breiteren Informationsbasis wurden zusätzlich zu den beschriebenen Kompartimenten bei den Routineprobenahmen und Screenings 2002 auch männliche Gonaden entnommen. Ziel der Untersuchung war, dass anhand histologischer Untersuchungen strukturelle Veränderungen im Gewebe nachgewiesen werden können. Strukturelle Veränderungen (z.B. Mischgonaden) werden in diesem Zusammenhang als Marker für endokrine Wirkung diskutiert. Hinsichtlich des Nachweises von nur einer Mischgonade bei insgesamt 145 untersuchten Tieren ist ebenso wie durch die Ergebnisse des Vtg-ELISA nicht von einer endokrinen Wirkung auf Populationsniveau auszugehen. Aufgrund der guten Markereigenschaft wird empfohlen, solche histologischen Untersuchungen in bestimmten Zyklen zu wiederholen. Zumindest könnten mit vergleichsweise geringem Aufwand Gonadenproben bei der jährlichen Routine-Probenahme gesammelt, fixiert und gelagert werden. Eine histo-pathologische Untersuchung könnte bei entsprechendem Bedarf retrospektiv erfolgen.

Um einen ökologisch und physiologisch relativ stabilen Zeitraum im Jahr auszuwählen, ist der Probenahmezeitraum für die Brassen-Probenahme nach KLEIN & PAULUS (1996) von Anfang August bis Ende September definiert. Der im Gegensatz dazu instabilste und daher für vergleichende Untersuchungen ungünstigste Zeitraum ist die Laichzeit, für die starke Schwankungen in den Aktivitäten des Cytochrom-P450-Enzymkomplexes und für das hormonelle System nachgewiesen wurden (vgl. KLEIN 2003). Insbesondere das hormonelle System ist an diesen Veränderungen maßgeblich beteiligt und beeinflusst über Wechselwirkungen alle anderen untersuchten Systeme ebenfalls. Um eine Vergleichbarkeit der über alle Probenahmeflächen gewonnenen Proben zu gewährleisten, sollte deshalb der Probenahmezeitraum zeitlich möglichst knapp gefasst werden. Entsprechend den Ergebnissen des Vtg-ELISA und der histologischen Untersuchung, die nahe legen, dass in Blankenese Fische einer physiologisch aktiveren Phase beprobt wurden, wird deshalb empfohlen die Brassen-Probenahme in Blankenese früher im Jahr, ebenfalls im August, durchzuführen.

Da allgemeine pathologische Veränderungen die Effekte endokrin wirksamer Substanzen stark überlagern können, wurden diese im Rahmen dieser Untersuchungen ebenfalls systematisch erfasst. Das an einigen Probenahmeflächen häufige und sehr stark ausgeprägte Auftreten von Fibrozyten und nekrotischer Zellen legt den Verdacht auf eine nicht näher definierbare, allgemeine stoffliche Belastung der Tiere nahe. Dieses von einer strukturellen Veränderung bis zum Absterben des reproduktiven Gewebes reichende Phänomen muss als deutliche Einschränkung der Reproduktionsfähigkeit der Tiere interpretiert werden. Auch aus diesem Grund wird empfohlen, diese sehr informative histologische Untersuchung in definierten Zeiträumen zu wiederholen.

# 11 Literatur

- ANDERSON, D.; YU, T.W.; PHILLIPS, B.J. & SCHMERZER, P. (1994): The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research* 307: 261-271.
- ANKLEY, G.; MIHAICH, E. & STAHL, R. (1998): Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-)estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(1): 68-87.
- ARUKWE, A.; KULLMANN, S.W. & HINTON, D.E. (2001a): Differential biomarker gene and protein expressions in nonylphenol and estradiol-17 $\beta$  treated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 129: 1-10.
- ARUKWE, A.; YADETIE, F.; MALE, R. & GOKSOYR, A. (2001b): In vivo modulation of nonylphenol-induced zonagenesis and vitellogenesis by the antiestrogen, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) in juvenile fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10: 5-15
- BARTEL, M.; KLEIN, R. & QUACK, M. (2002): Verknüpfung der Daten der Umweltprobenbank des Bundes mit Beobachtungsansätzen des Naturschutzes - Möglichkeiten der Auswertung und Bewertung. Projektbericht im Auftrag des Umweltbundesamtes, FG II 1-4. Berlin.
- BARTEL, M.; KLEIN, R.; NEITZKE, M.; NENTWICH, K.; PAULUS, M. & WAGNER, G. (2002): Beiträge zur Probenahme und Probenbeschreibung für die Umweltprobenbank des Bundes - Jahresbericht 2001. Univ. Trier, unveröffentlicht.
- BIEBERSTEIN, U.; BERBNER, T.; ISLINGER, M. & BRAUNBECK, T. (1999): Immunohistochemical localization of vitellogenin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using immunofluorescence. *Sci Total Environ* 233: 67-75.
- BÖCK, P. & ROMEIS, B. (1989): Mikroskopische Technik. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München., 698 Seiten.
- BORZINI, P.; LAZZARO, A.; MAZZUCCO, L.; SCHIAVO, R.; CONNOR, J. & SIENA, S. (2000): Platelet cryopreservation using second-messenger effectors and low-dose (2%) dimethyl sulfoxide – In vitro evaluation of post-thawing platelet activity with the platelet function analyzer. *Haematologica* 85(8): 885-887.
- BRAUNBECK, T. & MAHALUXMY N. (2003): Histologische Untersuchungen an Gonaden von Brachsen (*Abramis brama*) aus ausgewählten Fließgewässern der Bundesrepublik Deutschland. Im Auftrag des Fachbereichs VI – Biogeographie der Universität Trier (unveröffentlicht). 65 Seiten.
- 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., Oxford. S. 15-29.
- Bundesgesundheitsblatt (2000): Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 43: 555-589.
- CENSIER, K. (1997): Protocol for cryopreservation of muscle tissue. (ohne weitere Angabe)
- COLOSIO, C.; BARCELLINI, W. & CORSINI, E. (1998): L'immunotossilogia nella medicina del lavoro e dell'ambiente: prospettive, limiti e obiettivi di ricerca. *La medicina del lavoro* 89: 203-225.

- COTELLE, S. & FÉRARD, J.F. (1999): Comet assay in genetic ecotoxicology – A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246-255.
- DENSLOW, N.D.; BOWMAN, C.J.; FERGUSON, R.J.; LEE, H.S.; HEMMER, M.J. & FOLMAR, L.C. (2001): Induction of gene expression in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) treated with 17 $\beta$ -estradiol, diethylstilbestrol, or ethinylestradiol – the use of mRNA fingerprints as an indicator of gene regulation. *General and Comparative endocrinology* 121: 250-260.
- DI MAIO, J.J. & SHILLITO, R.R. (1989): Cryopreservation technology for plant and cell cultures. *J Tissue Culture Methods* 12: 163-169.
- DRAKE, L.A.; CEILLEY, R.I.; CORNELISON, R.L.; DOBES, W.L.; DORNER, W.; GOLTZ, R.W.; LEWIS, C.W, SALASCHE, C.L.; TURNER, M.L.C. & LOWERY, B.J. (1994): Guidelines of care for cryosurgery. *J Am Acad Dermatol* 31: 648-653.
- ECKARD, R. & MÜLLER, C. (1996): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Vollblut. In: Umweltbundesamt (Hrsg.): Umweltprobenbank des Bundes – Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von Umwelt- und Human-Organproben. Erich-Schmidt-Verlag, Berlin.
- ECKARD, R. & MÜLLER, C. (1996): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Blutplasma In: Umweltbundesamt (Hrsg.): Umweltprobenbank des Bundes – Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von Umwelt- und Human-Organproben. Erich-Schmidt-Verlag, Berlin.
- EISENFELD, A.J.; ATEN, R.F. & DICKSON, R.B. (1980): Estrogen receptor in the mammalian liver. In: MCLACHLAN, J.A. (Hrsg.): Estrogens in the environment. Raven Press, New York. S. 69-93.
- EISENFELD, A.J.; ATEN, R.F. & DICKSON, R.B. (1980): Estrogen receptor in the mammalian liver. In: MCLACHLAN, J.A. (Hrsg.): Estrogens in the environment. Raven Press, New York. S.69-93.
- EWING, H.H. (1972): Spermatogenesis in zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Anat Res* 172: 308.
- FAHY, G.M. (1986): Vitrification – A new approach to organ cryopreservation. *Prog Clin Biol Res* 224: 305-335.
- FLAMMARION, P.; DEVAUX, A.; NEHLS, S.; MIGEON, B.; NOURY, P. & GARRIC, J. (2002): Multibiomarker Responses in Fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51(2): 145-153.
- FOLMAR, L.C.; DENSLOW, N.D. & RAO, V. (1996): Vtg Induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives* 104(10): 1096-1101.
- FOLMAR, L.C.; GARDNER, G.R. & SCHREIBMAN, E. (2001): Vtg-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquatic Toxicology* 51: 431-441.
- FÖRLIN, L. & ANDERSSON, T. (1985): Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P-450 and conjugating enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 80B/3: 569-572.
- GIMENO, S.; KOMEN, H.; JOBLING, S.; SUMPTER, J. & BOWMER, T. (1998): Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*tert*-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquat Toxicol* 43: 93-109.
- GLOS, M.; BRAUNBECK, T.; DEVENTER, K.; MILTENBURGER, H.G.; NEHLS, S.; OBST, U.; SCHNURSTEIN, A.; SEGNER, H. & WESSLER, A. (2000): The comet assay as a tool to detect the genotoxic potential of surface water samples – *In vivo* and *in vitro* assays using green algae,

- protozoa, molluscs, fish, as well as primary and permanent cell cultures from fish and mammals. In: GRUMMT, T. (Hrsg.): Forschungsverbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1999. Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden, Dresden. S. 97-114.
- GOLDNER, J. (1938): A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purpose. *Amer J Path* 14: 237-243.
- GRIER, H. J. (1981): Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am Zool* 21: 345-357.
- HAMILTON, R.; HOLST, H.I. & LEHR, H.B. (1973): Successful preservation of canine small intestine by freezing. *J Surg Res* 14: 313-318.
- HARRIES, J.E.; SHEAHAN, D.A. & JOBLING, S. (1997): Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(3): 534-542.
- HECKER, M. (2001): Natürliche Variabilität endokriner Funktionen und ihre Modulation durch anthropogene Einflüsse – Untersuchungen am Beispiel des Brassen (*Abramis brama* L.) in der Elbe und in einem Referenzgewässer. Berichte aus dem Zentrum für Meeres- und Klimaforschung, Reihe E: Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft. zugl. Dissertation, Universität Hamburg. Hamburg. 148 Seiten.
- HENGSTLER, J.G.; RINGEL, M.; BIEFANG, K.; HAMMEL, S.; MILBERT, U.; GERL, M.; KLEBACH, M.; DIENER, B.; PLATT, K.L.; BÖTTGER, T.; STEINBERG, P. & OESCH, F. (2000b): Cultures with cryopreserved hepatocytes – applicability for studies of enzyme induction. *Chemico-Biological Interactions* 125: 51-73.
- HENGSTLER, J.G.; UTESCH, D.; STEINBERG, P.; PLATT, K.L.; DIENER, B.; RINGEL, M.; SWALES, N.; FISCHER, T.; BIEFANG, K.; GERL, M.; BÖTTGER, T. & OESCH, F. (2000a): Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metabolism Reviews* 32(1): 81-118.
- HENNIG, W. (1995): Genetik. Springer, Berlin. 776 Seiten.
- HIRSH, A. (1987): Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. *Cryobiology* 24: 214-228.
- IDEL, H. & STILLER-WINKLER, R. (1997): Immunologische Diagnostik. In: WICHMANN, H.-E.; SCHLIPKÖTER, H-W. & FÜLGRAFF, G. (Hrsg.): Handbuch der Umweltmedizin: III-2.2.5. Ecomed Verlag. Landsberg. S. 1-7.
- ISHIBASHI, H.; TACHIBANA, K.; TSUCHIMOTO, M.; SOYANO, K.; ISHIBASHI, Y.; TAKAO, Y.; TOMINAGA, N. & ARIZONO, K. (2001): *In vivo* testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Health Science* 47(2): 213-218.
- ISLINGER, M.; BIEBERSTEIN, U.; KNÖRR, S. & BRAUNBECK, T. (2001): Östrogene Wirkung von Umweltchemikalien – Endokrin wirksame Substanzen in Fischen und Fischzellen – Teststrategien zur ökotoxikologischen Prüfung. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsbericht 297 65 001/01. Heidelberg. 302 Seiten.
- ISLINGER, M.; PAWLOWSKI, S. & BRAUNBECK, T. (1999): Vitellogenin als Marker für östrogen wirksame Stoffe im Wasser. ATV-Schriftenreihe 15: 125-152.

- 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: 94-202.
- JULKUNEN, A.; SCHILLER, F.; MÜLLER, D.; KLINGER, W. & HÄNNINEN, O. (1986): Monooxygenase activity of fish liver in biomonitoring aquatic environment. *Archives of Toxicology*, Suppl. 9: 378-381.
- KAMMANN, U. (1997): Comet-assay – Application in environmental monitoring. In: MÜLLER, W.E.G. (Hrsg.): Sitzungsberichte der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse, Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt, Band 8. S. 105-109.
- KAMMANN, U. (1998): Toxische Wirkungen von Schadstoffen auf Fischzellen – Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mit dem Comet-Assay. *Inf Fischwirtsch* 45(3): 109-112.
- KARBE, L.; WESTENDORF, J. & BECK, M-P. (2000): Ökotoxikologische Relevanz endokrin wirksamer Stoffe in der aquatischen Umwelt – Untersuchungen am Modell Elbe. Abschlussbericht FE-Vorhaben 29765001/02. Univ. Hamburg. 113 Seiten.
- KARBE, L.; WESTENDORF, J. & BECK, M-P. (2000): Ökotoxikologische Relevanz endokrin wirksamer Stoffe in der aquatischen Umwelt – Untersuchungen am Modell Elbe. Abschlußbericht FE-Vorhaben 29765001/02. Universität Hamburg. 113 Seiten.
- KARELS, A.; MARKKULA, E. & OIKARI, A. (2001): Reproductive, biochemical, physiological, and population responses in perch (*Perca fluviatilis* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.) downstream of two elemental chlorine-free pulp and paper mills. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(7): 1517-1527.
- KLEIN, R. & PAULUS, M. (1996): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassen. In: Umweltbundesamt (Hrsg.): Umweltprobenbank des Bundes – Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von Umwelt- und Human-Organproben. Erich-Schmidt-Verlag, Berlin.
- KLEIN, R. (2003): Informationsgehalt und Qualität von Umweltproben nationaler Umweltprobenbanken als integrale Bestandteile der Umweltbewertung. Habilitationsschrift, Universität des Saarlandes. Saarbrücken.
- KLEIN, R.; BARTEL, M.; NEITZKE, M.; NENTWICH, K.; PAULUS, M.; QUACK, M. & WAGNER, G. (2003): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassen. In: BARTEL, M.; KLEIN, R.; NEITZKE, M.; NENTWICH, K.; PAULUS, M.; QUACK, M. & WAGNER, G.: Beiträge zur Probenahme und Probenbeschreibung für die Umweltprobenbank des Bundes - Jahresbericht 2002. Univ. Trier, unveröffentlicht.
- KNÖRR, S. & BRAUNBECK, T. (2002): Decline in reproduction success, sex reversal and developmental alterations in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol. *Ecotox Environ Safety* 51: 187-196.
- KRZYSTYNIAK, K.; TRYPHONAS, H. & FOURNIER, M. (1998): Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 103(Suppl. 9): 17-22.
- LANGE, U.; GOKSOYR, A.; STAGG, R.; DANISCHEWSKI, D.; SIEBERS, D.; BUCHHOLZ, F. & KARBE, L. (1994): Cytochrome P450 enzyme system in the liver of dab (*Limanda limanda*) – An interim report. In: KARBE, L.; MÄDLER, K. & WESTENDORF, J. (Hrsg.): Biologische Effekte von Schadstoffe und toxisches Potential von Wasser und Sediment in Elbe und Nordsee. Hamburg. S. 57-64.
- LEHMANN, J.; PARIS, F.; STÜRENBERG, F.-J. & BLÜM, V. (1999): Ökotoxikologische Untersuchungen an freilebenden Brassen (*Abramis brama*) mit Schwerpunkt auf den Einfluss von

- Xenoöstrogenen in NRW – Ein Vergleich der Fischbestände aus dem Trinkwasserreservoir Wahnbachtalsperre und aus dem Niederrhein (Fluss-km-Strecke 798-804). LÖBF-Jahresbericht 1999 1-3.
- LEHMANN, J.; PARIS, F.; STÜRENBERG, F.-J. & BLÜM, V. (2000): Ökotoxikologische Untersuchungen an freilebenden Brassen. LÖBF-Jahresbericht 1999: 127-131.
- LINDL, T. (2000): Zell- und Gewebekultur – Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 5. überarb. und erw. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- LUSTER, M.I.; SELGRADE, M.J.K.; GERMOLEC, D.R.; BURLISON, F.G.; KAYAMA, F.; COMMENT, C.E. & WILMER, J.L. (1994): Experimental studies on immunosuppression: Approaches and application in risk assessment. In: DEAN, J.H.; LUSTER, M.I.; MUNSON, A.E. & KIMBER, I. (Hrsg.): Immunotoxicology and immunopharmacology. Raven Press, New York. S. 51-70.
- MASTERS, J.R.W. (Hrsg.) (2000): Animal cell culture – A practical approach. Oxford University Press, Oxford. 334 Seiten.
- MATTHIESSEN, P. & SUMPTER, J.P. (1998): Effects of estrogenic substances in the aquatic environment. In: BRAUNBECK, T.; STREIT, B. & HINTO D.E. (Hrsg.): Fish ecotoxicology. Birkhäuser, Basel, S. 319-336.
- METCALFE, T.L.; METCALFE, C.D.; KIPARISSIS, Y.; NIIMI, A.J.; FORAN, C.M. & BENSON, W.H. (2000): Gonadal development and endocrine response in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *o,p'*-DDT in water or through maternal transfer. *Environ Toxicol Chem* 19: 1893-1900.
- MEYERS, T.R. & HENDRICKS, J.D. (1985): Histopathology. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. (Hrsg.): Fundamentals of aquatic toxicology. Hemisphere Publ. Corp., Washington, S. 283-334.
- MONOD, G. & VINDIMIAN, E. (1991): Effect of storage conditions and subcellular fractionation of fish liver on cytochrome P-450-dependent enzymatic activities used for the monitoring of water pollution. *Water Research* 25(2): 173-177.
- MOORE, G.E.; GERNER, R.E. & FRANKLIN, H.A. (1967): Culture of normal human leukocytes. *Journal of the American Medical Association* 199: 519-524.
- NEHLS, S. & SEGNER, H. (2001): Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay. *Environmental Toxicology* 16(4): 321-329.
- NICHOLS, K.M.; SNYDER, E.M.; SNYDER, S.A.; PIERENS, S.L.; MILES-RICHARDSON, S.R. & GIESY, J.P. (2001): Effects of nonylphenol ethoxylate exposure on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Environ Toxicol Chem* 20: 510-522.
- NISHIMOTO, M. & VARANASI, U. (1985): Benzo[a]pyrene metabolism and DNA adduct formation mediated by English sole liver enzymes. *Biochemical Pharmacology* 34(2): 263-268.
- NOLAN, M.; JOBLING, S.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J.P. & TYLER, C.R. (2001): A histological description of intersexuality in the roach. *J Fish Biol* 58: 160-176.
- O'HALLORAN, K.; AHOKAS, J.T. & WRIGHT, P.F.A. (1998): Response of fish immune cells to in vitro organotin exposure. *Aquatic Toxicology* 40: 141-156.
- OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U., STROBEN, E., BAUER, B., BETTIN, C. & FIORONI, P. (1995): Androgene Effekte zinnorganischer Verbindungen bei Mollusken. In: Umweltbundesamt (Hrsg.): Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung. UBA-Texte 65/95. Berlin: 77-85.

- OLIVEREAU, M. & OLIVEREAU, J. (1979): Effect of estradiol-17 $\beta$  on the cytology of the liver, gonads and pituitary, and on plasma electrolytes in the female freshwater eel. *Cell Tissue Res* 199: 431-454.
- PUDNEY, J. (1995): Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech* 32: 459-497.
- REN, L.; LATTIER, D. & LECH, J.J. (1996): Estrogenic activity in rainbow trout determined with a new cDNA probe for vitellogenesis, pSG5Vg1.1. *Bull Environ Contam Toxicol* 56: 287-294.
- RICE, C.D.; KERGOSENIEN, D.H. & ADAMS, S.M. (1996): Innate immune function as a bioindicator of pollution stress in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 33: 186-192.
- SCHWAIGER, J. & NEGELE, R. D. (1998): Plasma vitellogenin – A blood parameter to evaluate exposure of fish to xenoestrogens. *Acta Vet Brno* 67: 257-264.
- SELMAN, K.; WALLACE, R.A.; SARKA, A. & XIAOPING, Q. (1993): Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *J Morphol* 218: 203-224.
- SHORE, K.A. & RADWAY, J. (2000): Optimizing cryopreservation protocols for the Hawaii culture collection. University of Hawaii, Manoa. 18 Seiten.
- SIKKA, H.C.; RUTKOWSKI, J.P.; KANDASWAMI, C.; KUMAR, S.; EARLEY, K. & GUPTA, R.C. (1990): Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo[a]pyrene. *Cancer Letters* 49: 81-87.
- SUMPTER, J.P. & JOBLING, S. (1996): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103: 173-178.
- SUMPTER, J.P.; JOBLING, S. & TYLER, C.R. (1996): Estrogenic substances in the aquatic environment and their potential impact on animals, particularly fish. In: TAYLOR, E.W. (Hrsg.) Toxicology of aquatic pollution. Soc. Exp. Biol. Sem. Ser. 57. S. 205 ff.
- TAKASHIMA, F. (1986): Changes in oocyte number during maturation of female masu salmon. *Bull Japan Soc Sci Fish* 52: 231-237.
- TYLER, C.R., VAN DER EERDEN, B., JOBLIN, S., PANTER, G. & SUMPTER, J.P. (1996): Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *Journal of Comparative Physiology B*. 166: 418-426.
- TYLER, C.R.; JOBLING, S. & SUMPTER, J.P. (1998): Endocrine disruption in wildlife – A critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol* 28: 319-361.
- VERSONNEN, B.J.; DE COEN, W. & JANSSEN, C.R. (1999): Synthesis of molecular probes to detect endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) – Isolation of vitellogenin mRNA. *Med Fac Lanbouww Univ Gent* 64(5): 239-242.
- VOM SAAL, F.S.; MONTANO, M.M. & WANG, M.H. (1992): Sexual differentiation in mammals. In: COLBORN, T. & CLEMENT, C. (Hrsg.): Chemically-induced alterations in sexual and functional development - The wildlife/human connection. Princeton Scientific Publ., Princeton. S. 17-84.
- WEEKS, J.M. (1998): Effects of pollutants on soil invertebrates - Links between levels. In: SCHÜÜRMAN, G. & MARKERT, B. (Hrsg.): Ecotoxicology. John Wiley & Sons und Spektrum Akademischer Verlag, New York. S. 645-660.
- ZAROOGIAN, G.; GARDNER, G.; HOROWITZ, D.B.; GUTJAHR-GOBELL, R.; HAEBLER, R. & MILLS, L. (2001): Effect of 17 $\beta$ -estradiol, *o,p'*-DDT, octylphenol and *p,p'*-DDE on gonadal development and liver and kidney pathology in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat Toxicol* 54: 101-112.

---

ZIMMERMANN, G.; TENNYSON, C. & DRAPANAS, T. (1971): Studies of preservation of liver and pancreas by freezing techniques. *Transpl Proc* 1: 657-659.



	Prossen		Zehren		Barby		Cumlosen		Blankenese	
	Sex	Vtg	Sex	Vtg	Sex	Vtg	Sex	Vtg	Sex	Vtg
1	m	0	m	0	w	579	w	1694	w	5226
2	m	0	w	372	w	680	m	4	m	0
3	m	0	m	0	w	296	w	1187	w	1751
4	m	0	m	0	w	279	m	0	w	3908
5	m	0	w	372	w	271	w	184	m	0
6	m	0	w	661	w	215	w	973	w	0
7	w	101	w	265	w	335	m	0	m	0
8	m	0	w	184	w	92	w	626	m	0
9	m	0	w	31	m	0	w	63	m	0
10	w	752	w	405	m	0	w	379	m	0
11	m	0	w	62	m	0	m	56	w	4396
12	m	0	w	651	m	0	w	0	m	1
13	w	80	m	0	m	0	w	886	m	0
14	w	379	w	913	w	0	w	1924	m	0
15	w	612	m	0	m	0	m	0	m	0
16	m	0	w	659	m	0	m	0	m	0
17	w	346	m	0	m	0	w	1578	m	0
18	w	1	m	0	w	372	m	0	w	0
19	w	240	w	221	w	0	w	165	m	0
20	-	-	w	379	m	0	m	0	m	1

	Saale		Mulde		Ulm		Kelheim		Jochenstein	
	Sex	Vtg	Sex	Vtg	Sex	Vtg	Sex	Vtg	Sex	Vtg
1	w	618	w	80	m	0	m	0	w	652
2	m	0	w	323	m	0	w	751	w	0
3	w	221	w	719	m	0	m	0	m	0
4	m	0	w	613	w	2171	m	0	m	410
5	m	1	m	0	m	0	w	700	m	0
6	w	652	w	636	w	140	m	0	m	0
7	m	0	w	617	m	0	m	146	m	72
8	w	91	m	2	w	790	m	0	w	893
9	m	0	m	0	w	0	w	1102	m	0
10	m	3	m	0	m	0	m	0	w	997
11	w	385	m	0	m	0	w	756	w	626
12	w	760	w	1466	m	0	m	0	w	2566
13	w	521	m	1	m	0	m	0	m	0
14	w	385	w	696	m	0	w	1291	m	0
15	w	731	m	1	w	329	w	234	w	427
16	m	0	w	636	w	654	m	0	w	626
17	w	296	m	70	m	0	m	125	m	0
18	w	159	m	72	w	1651	w	68	w	1538
19	m	0	m	76	-	-	m	0	m	3
20	w	196	m	1	-	-	m	98	m	0

Sex: m=männlich, w=weiblich; Angaben von Vtg in [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]