

Schlußbericht zum
Forschungsvorhaben 03F0551A

Toxokinetik und -dynamik ausgewählter individueller chlorierter Biphenyle

Prof. Dr. D. Schnack (Projektleiter)

ausführende Mitarbeiter:

Dr. R. Schneider (Berichterstatter)

A. Korves

unter Beteiligung von:

Prof. Dr. J. C. Duinker, G. Petrick

Institut für Meereskunde
an der Universität Kiel
Düsternbrooker Weg 20
2300 Kiel 1

Dezember 1991

KURZFASSUNG

In Aquarienversuchen wurden Steinbutts (Scophthalmus maximus) durch intraperitoneale Injektion drei ausgewählten Chlorbiphenylen (PCBs) ausgesetzt, nämlich 3,3',4,4'-Tetra-, 2,3',4,4',5-Penta- und 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl. Nach 1-7 Tagen wurden die Aktivitäten zweier hepatischer mischfunktioneller Oxygenasen gemessen, nämlich der 7-Ethoxyresorufin- (EROD) und der 7-Ethoxy-cumarin-O-deethylase (ECOD). Beide Monooxygenasen sind indikativ für unterschiedliche Typen von MFO-Induktion. Als Kontrollen dienten unbehandelte, mit reinem Fischöl (, das im übrigen als Träger der Chlorbiphenyle eingesetzt wurde,) sowie mit β -Naphtho-flavon, einem Induktor beider Monooxygenasen, beimpfte Fische. Die Ergebnisse legen im Zusammenhang mit der Literatur zwei im Hinblick auf marine Umwelt-Meßprogramme wichtige Schlüsse nahe:

Bei der Auswahl von Chlorbiphenylen, die im chemischen Monitoring erfaßt werden sollten, scheint die z. Zt. erkennbare Neigung zur besonderen Beachtung strukturell zur Planarität befähigter Kongenere, die eine besonders hohe toxische 2,3,7,8-TCDD-Äquivalenz aufweisen, wenig sinnvoll: sie treten kaum in Umweltproben auf; auch vermeintlich harmlose Kongenere können durchaus synergistische und/oder antagonistische Effekte zeitigen; die Toxodynamik von PCB-Gemischen ist bei aller Ähnlichkeit nicht mit derjenigen des TCDD deckungsgleich.

In synoptischer Betrachtung mit anderen biologischen und mit chemischen Meßwerten können Aktivitätsbestimmungen an (bevorzugt mehreren unterschiedlichen) hepatischen Monooxygenasen von Fischen durchaus aufschlußreich sein. Angesichts einer Vielzahl von Wechselwirkungen des MFO-Systems mit endogenen und exogenen Substraten lassen isoliert gemessene, erhöhte MFO-Aktivitäten in Fischen höchstens in Ausnahmefällen monokausale Rückschlüsse auf eine Belastung mit anthropogenen Schadstoffen zu.

ABSTRACT

In tank experiments, turbot (Scophthalmus maximus) were exposed to three selected chlorobiphenyls, 3,3',4,4'-tetra-, 2,3',4,4',5-penta- and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl, respectively, by IP-injection. After 1-7 days, activities of two hepatic mixed-function oxygenases were estimated, i.e. 7-ethoxyresorufin- (EROD) and 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD). These monooxygenases are indicative of the major types of xenobiotics-induceable MFOs. Untreated fish and/or fish treated with fish oil or β -naphthoflavone in fish oil, respectively, served as controls. Two important conclusions are discussed with respect to marine monitoring programmes.

There is recently a wide-spread inclination towards focussing efforts in chemical monitoring of PCBs to planar congeners of high 2,3,7,8-TCDD toxicity equivalents. It is argued that a) planar congeners rarely occur in environmental samples, b) putatively harmless congeners have been shown to cause synergistic and antagonistic effects, and c) the toxodynamics of PCB mixtures, in spite of many similarities, is not congruent with that of TCDD. Therefore, analysts should not concentrate too exclusively on planar congeners.

In conjunction with other biological and chemical parameters, the estimation of activities of (favourably several) hepatic monooxygenases of fish is a useful tool in biological effects monitoring. However, since there are a variety of interactions of the MFO system with exogenous as well as endogenous substrates, elevated MFO activities alone can only exceptionally allow for conclusions as to monocausal relations with anthropogenic contaminants.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. ZIELSETZUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	4
2.1. EINRICHTUNG UND BETRIEB DER VERSUCHSAQUARIEN	4
2.2. AUSGANGSMATERIAL	6
2.3. VORARBEITEN UND METHODEN ZUR MFO-BESTIMMUNG	7
2.3.1. GRUNDSÄTZLICHES ZUR PROBENNAHME UND BEARBEITUNG	7
2.3.2. PRÄPARATION UND LAGERUNG DER MIKROSOMEN	8
2.3.3. PROTEINGEHALT DER MIKROSOMEN-SUSPENSION	11
2.3.4. MESSUNG DER MONOOXYGENASE-AKTIVITÄTEN	11
2.3.4.1. MESSUNG DER 7-ETHOXYCUMARIN-O-DEETHYLASE-AKTIVITÄT	12
2.3.4.2. MESSUNG DER 7-ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE-AKTIVITÄT	14
2.4. ZIELE, MATERIAL UND BEDINGUNGEN DER VERSUCHE	16
2.4.1. VERSUCH "ÖLE"	16
2.4.2. VERSUCH "CB 77/1"	17
2.4.3. VERSUCH "CB 77/2"	19
2.4.4. VERSUCH "3 CBs"	20
2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG	23
3. ERGEBNISSE	24
3.1. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES VERSUCHS "ÖLE"	24
3.2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES VERSUCHS "CB 77/1"	28
3.3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES VERSUCHS "CB 77/2"	32
3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES VERSUCHS "3 CBs"	37
4. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION UND FOLGERUNGEN	44
4.1. ZUR AUSWAHL VON PCB-KONGENEREN FÜR DAS CHEMISCHE SCHADSTOFFMONITORING	47
4.2. ZUR AUSSAGEKRAFT VON MFO-AKTIVITÄTEN IM RAHMEN DES BIOLOGISCHEN EFFEKTMONITORING	50
4.3. ZUR BELASTUNG DER STEINBUTTS IN DER AQUAKULTUR AN DER KIELER FÖRDE (BÜLK)	53
5. LITERATUR	54

1. ZIELSETZUNG

"Meeresverschmutzung" durch anthropogene Substanzen ist nach der gängigen Definition insbesondere durch schädliche Wirkungen auf marine Ökosysteme oder individuelle Organismen charakterisiert. Durch eine Vielzahl nationaler und internationaler Forschungs- und Monitoringprogramme, die seit dem Anfang der siebziger Jahre ins Leben gerufen wurden, gibt es eine Flut von Daten über die Gehalte bestimmter Schadstoffgruppen in allen Matrices, so auch in Fischgeweben. Die chemische Analytik wurde mit großem Aufwand im Laufe der Jahre erheblich verfeinert und zunehmend verlässlicher; die biologisch/(öko)toxikologische Bedeutung der Daten bleibt bisher aber zumeist unklar.

Ein besonders hohes toxisches Potential wird der Gruppe der hochgradig persistenten und lipophilen (und deshalb besonders bioakkumulativen) halogenierten Kohlenwasserstoffe beigemessen. Dazu gehören neben einigen sehr bekannten Pestiziden, wie dem Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), dem Hexachlorbenzol (HCB), den Isomeren des Hexachlorcyclohexan (HCH, z.B. Lindan) und den Cyclodienen (Aldrin, Dieldrin, Endrin), einige Produkte industrieller Anwendungen, wie die polybromierten und polychlorierten Biphenyle (PBBs, PCBs), sowie die bei der Synthese und unvollständigen Verbrennung halogenierter Verbindungen entstehenden halogenierten Dibenzofurane und Dibenzodioxine.

Das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) gilt als eine der giftigsten jemals vom Menschen produzierten Chemikalien. Aufgrund der produzierten und in die Umwelt gelangten und noch gelangenden Mengen wird den PCBs aber dennoch ein größeres Gefährdungspotential zugeschrieben.

PCBs sind Gemische von theoretisch 209 Einzelkongeneren, von denen in den Gemischen etwa ein Drittel regelmäßig vertreten sind. Obwohl es nach der Entwicklung hochauflösender multidimensionaler kapillargaschromatographischer Techniken möglich ist, diese vollständig zu bestimmen, ist dies für den Routineeinsatz in Monitoringprogrammen zu aufwendig. Deshalb hat man sich in den meisten derartigen Programmen darauf geeinigt, eine Auswahl von Kongeneren zu messen. Das wesentliche Kriterium für deren Auswahl ist die eindeutige Identifizierbarkeit dieser Verbindungen mittels eines herkömmlichen Kapillargaschromatographen. DUINKER et al. (1988a) warfen dagegen die Frage auf, ob die individuelle Toxizität der Kongenere nicht das entscheidendere Kriterium sein sollte.

Ein wesentliches Ziel dieses Vorhabens bestand in der Überprüfung der ökotoxikologischen Relevanz von PCB-Komponenten als Entscheidungsgrundlage für die Auswahl im Rahmen des chemischen Schadstoffmonitoring.

Die Vielzahl von Xenobiotika, die in die Meeresumwelt gelangen, könnte wegen der Spezifität der spurenanalytischen Methoden nur unter unvertretbarem Aufwand vollzählig chemisch analysiert werden. Selbst vollständige Inventarien von Xenobiotika könnten aber nicht die Frage nach biologischen Effekten beantworten. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, ein biologisches Effekt-Monitoring einzurichten und durchzuführen. Dies hätte gegenüber der chemischen Analytik zugleich den Vorzug, daß die integrierte synergistische bzw. antagonistische Wirkung der Summe der einwirkenden Einzelverbindungen erfaßt würde.

Schädliche Wirkungen auf Ökosystem- oder Populations-Ebene sind wegen der hohen natürlichen Variabilitäten kaum jemals kausal zu erkennen. Daß gewisse Xenobiotika Funktionen des Gesamttieres, wie die Fortpflanzung oder das Immunsystem von Tieren beeinträchtigen können, ist plausibel, der kausale Nachweis ist aber selten eindeutig gelungen. Da Vergiftungen in der Regel auf molekularer bzw. biochemischer Ebene einsetzen, ist der Einfluß wahrscheinlich am ehesten auf dieser Ebene erkennbar.

Unter den Meßgrößen, die für ein biologisches Effekt-Monitoring diskutiert werden, wird z. Zt. besonders die Aktivität bestimmter Monooxygenasen der Fischleber propagiert. Es sind dies an das endoplasmatische Retikulum der Zellen gebundene, Cytochrom P₄₅₀-abhängige Enzyme, die in ihrer Gesamtheit als mischfunktionelle Oxygenasen (MFOs, MFO-System) bezeichnet werden. Dieses System, das besonders intensiv an Säugern untersucht worden ist, katalysiert eine Vielzahl von Umsetzungen körpereigener und körperfremder Substrate. Die besondere Bedeutung der MFOs im Abbau lipophiler zyklischer Fremdstoffe besteht in der hydrolytischen Spaltung (Biotransformation) von aromatischen Ringen, die eine oftmals nachfolgende Konjugation polarer Reste ermöglicht. Die damit hydrophiler gewordene Verbindung ist reaktionsfreudiger und kann leichter ausgeschieden werden. Nach Zufuhr zahlreicher Xenobiotika, Pharmaka und Noxen steigt die Aktivität des MFO-Systems (Induktion), so daß die Substanzen beschleunigt abgebaut werden ("Entgiftung"). Die Leber, als das zentrale Stoffwechselorgan der Wirbeltiere, ist besonders reich an MFOs. Aus in Felduntersuchungen festgestellten erhöhten hepatischen MFO-Aktivitäten ist von einigen Autoren auf Induktion durch Schadstoffe geschlossen worden.

Ein weiteres wesentliches Ziel bestand deshalb darin, die Aussagekraft von Monooxygenase-Aktivitäten zur physiologisch/toxikologischen Bewertung im Rahmen des biologischen Effekt-Monitoring oder allgemein zur Erkennung der Präsenz umweltgefährdender Stoffe besser beurteilen zu können.

Dazu sollten einzelne in der Literatur beschriebene Methoden zur Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität auf ihre Handhabbarkeit, Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse mit Literaturwerten getestet und die brauchbarsten Methoden für den Routineeinsatz übernommen und optimiert werden. Sodann sollten Steinbutts unter kontrollierten Bedingungen mit ausgewählten Chlorbiphenylen kontaminiert werden, um Reaktionen des MFO-Systems zu testen.

Schließlich sollte zu beurteilen versucht werden, ob freilebende Fische in der Kieler Förde (bzw. Steinbutts aus marinen Aquakultur an ihrem Ufer) Symptome einer negativen Beeinflussung aufweisen. Der Kieler Hafen wurde in der Vergangenheit als ein Schwerpunkt ("hot spot") der PCB-Verschmutzung der Kieler Bucht identifiziert.

Dazu sollten Fische (Steinbutts, Scophthalmus maximus) aus einem an der Kieler Förde gelegenen Aquakulturbetrieb (Fa. Butt, Bülk) bezogen und in das Zentrallabor für die Haltung von Meeresorganismen des Instituts für Meereskunde überführt werden. Dort sollten die Fische definiert mit ausgewählten individuellen Chlorbiphenylen kontaminiert werden, um die Höhe der biologisch/toxikologischen Reaktion (MFO-Induktion) zu ermitteln.

Die jeweils zu applizierende Dosis sollte das ca. Zehnfache der "natürlichen" Gehalte der Fische in der Aquakulturanlage bzw. in der Kieler Förde nicht übersteigen. Um die Dosis festsetzen zu können, sollten der durchschnittliche Ausgangsgehalt der Steinbutts und ihres Futters sowie die Gehalte ausgewählter freilebender Fische und ihrer Nährtiere bestimmt werden.

Eine enge Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. J. C. Duinker, Abtlg. Meereschemie, war unverzichtbar, zumal das Vorhaben von dort angeregt worden war. Wegen der Komplexität toxikologisch-biochemisch-physiologischer Wechselwirkungen sollten zusätzlich andere Arbeitsgruppen des Instituts für Meereskunde, insbesondere die steroidphysiologisch orientierte Gruppe um Priv.-Doz. Dr. F. Buchholz, Abtlg. Meereszoologie, sowie Mitarbeiter des Toxikologischen Instituts der Universität Kiel zur Bearbeitung der interessierender Teilaspekte zu gewinnen, um dadurch eine längerfristige ökophysiologisch/ökotoxikologische Zusammenarbeit zu begründen.

Die für das Vorhaben nötigen Analysen zur PCB-Belastung der Kieler Bucht wurden als Diplomarbeit aus dem Projekt ausgegliedert (REUSCH, 1991, Kurzfassung in Annex 3.1). - Unter Benutzung der Einrichtungen und Beratung durch Projekt-Mitarbeiter untersuchten SABOROWSKI et al. (1990) im Rahmen einer Semesterarbeit einige physiologische Reaktionen des Steinbutts auf Hunger- und Salinitätsstreß. (Kurzfassung in Annex 3.2) - An den Vergiftungsversuchen beteiligte sich ELNABAWI (in Vorber.), der über die Reaktionen der K^+ , Na^+ -ATPasen und Mg^{2+} -ATPasen in Kiemen und Gehirn arbeitete.

Es war bei der Antragstellung davon ausgegangen worden, daß alle instrumentellen und räumlichen Voraussetzungen für das Vorhaben erfüllt wären. Es stellte sich heraus, daß es in den temperaturkonstanten Räumen des Zentrallabors nicht möglich war, die Wassertemperatur im notwendigen Durchfluß auch nur annähernd konstant zu halten. So schlug die Variabilität des Tiefenwassers der Förde am Ansaugstutzen bis in die Versuchsbecken durch. - Zu erheblichen Verzögerungen führte, bis zur Zusammenarbeit mit dem Toxikologischen Institut ab Sommer 1991, der Mangel des Instituts für Meereskunde an einer leistungsfähigen Ultrazentrifuge ($\geq 100.000 * g$): da das MFO-System sehr labil ist, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß ein Teil der Aktivität durch die zusätzlichen Zeitverluste beim Transport der Leberhomogenat- bzw. Mikrosomensuspensionen (im Eisbad) zwischen den Einrichtungen zusammenbrach.

2. MATERIAL UND METHODEN

Obwohl das Vorhaben in enger Abstimmung und Kooperation mit der Abtlg. Meereschemie durchgeführt wurde, wird im Folgenden nur auf biologische und physiologische Methoden eingegangen. Die zur Analyse der Chlorbiphenyle herangezogenen Methoden sind publiziert (z.B. DUINKER et al., 1988b).

2.1. EINRICHTUNG UND BETRIEB DER VERSUCHSAQUARIENANLAGE

Die Versuchsaquarienanlage wurde in einem temperaturkonstanten Raum des Zentrallabors für die Hälterung von Meeresorganismen des Instituts für Meereskunde eingerichtet. Dieser Raum war aus Sicherheitsgründen (Vergiftungsgefahr) nur für Projekt-Mitarbeiter zugänglich.

Die Anlage bestand aus 11 Glasbecken à 160 l (Kantenlänge 100 * 40 cm), die über Polyethylenschläuche individuell mit gefiltertem Seewasser (ca 1 l/min) und Druckluft versorgt wurden. Als Abläufe dienten u-förmige Glasrohre, die vom Boden der Becken in Niveaurohre führten.

Es ist nicht auszuschließen, daß Spiegelungserscheinungen an den ungeschliffenen Glaswänden der Becken einen gewissen Streß auf die Fische ausübten; diese Gefahr wurde jedoch in Kauf genommen, da Kunststoffbecken eine größere Kontaminationsgefahr mit sich gebracht hätten.

Nach Fertigstellung der Anlage wurde die Mehrzahl der Becken zunächst zur Spülung mit Seewasser gefüllt und ca. 3 Wochen im Durchlauf betrieben (jeweils ca. 5 l/min), um etwaige Verunreinigungen aus den Materialien zu entfernen. Anschließend Analysen durch die Meereschemiker von Wasser aus einem der Becken ergaben einen Gesamt-PCB-Gehalt von ca. 500 pg/l, was etwa der Konzentration im Wasser des Kieler Hafens zu entsprechen schien. Da in dieser Probe aber, anders als im Hafenwasser, keine polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe nachzuweisen waren, entstand der Verdacht, daß die Quelle der Verunreinigung im Hause liege.

Weitere Analysen ergaben in einer direkt vor dem Eingangsfilter genommenen Wasserprobe eine Konzentration von ca. 300 pg/l und in einer Probe direkt hinter dem Filter ca. 30 pg/l. Somit war der Verdacht bestätigt, daß das aus dem Hafen geförderte Seewasser durch das Eingangsfilter zunächst deutlich im PCB-Gehalt reduziert wurde, und daß es anschließend innerhalb des IfM mit PCBs kontaminiert wurde. Nachfragen ergaben, daß das Seewasserversorgungssystem der neuen Zentrallabors des IfM überwiegend aus Kunststoff gefertigt ist, und daß alle Leitungen aus verklebten PVC-Rohren bestehen. (Bei der Konzeption der Wasserversorgung war größter Wert darauf gelegt worden, eine Kontamination durch Schwermetalle zu vermeiden.)

Aufgrund dieses Befundes wurde der für das Vorhaben benutzte temperaturkonstante Raum mittels einer gesonderten Leitung aus kontaminationsarmem Material (Polyäthylen- bzw. verschraubten PVC-Rohren) versorgt, die unmittelbar hinter dem Eingangskiesfilter ansetzt. Nach Installation dieser Leitung (Anfang Mai 1989) ergaben wiederholte Analysen des Wassers aus den Versuchsbecken regelmäßig Gesamt-PCB-Konzentrationen von weniger als 10 pg/l.

Da sich bald herausstellte, daß die Raumtemperatur wegen der durchfließenden Meerwassermenge keinen merklichen Einfluß auf die Wassertemperatur hatte, die also überwiegend von der jeweiligen Temperatur am Ansaugstutzen in der Förde abhing, wurde die Raumtemperatur durchgehend auf 5 °C eingestellt.

Es wurde gehofft, dadurch wenigstens die sommerlichen Temperaturspitzen abmildern zu können. Die Beleuchtung des Raumes wurde über den gesamten Zeitraum mittels einer Schaltuhr annähernd dem natürlichen Tag/Nacht-Rhythmus angepaßt.

Die routinemäßige Überwachung von Salinität, pH und Ammoniumkonzentration des Wassers zeigte auch nach Fütterung keine für die Fische ungünstigen Werte. Zwar sank der Sauerstoffgehalt des Hafenwassers im Sommer kurzfristig bedenklich tief, in der Anlage traten jedoch dank der zusätzlichen Belüftung keine Probleme für die Fische auf.

Dagegen bedeutete im Sommer die hohe Temperatur (bis zu 23 °C) des Fördewassers, die beim Durchfluß von ca. 1 l/min (pro Becken) trotz Kühlung des Raumes auf 5 °C weitgehend erhalten blieb, einen deutlichen Stress für die Fische: die Steinbutts lagen nurmehr träge am Beckengrund und nahmen das angebotene Futter nicht an. (Flundern, mit denen zu experimentieren kurzfristig erwogen wurde, erkrankten bei Temperaturen oberhalb von ungefähr 15 °C größtenteils an Flossenfäule und Hautläsionen und wiesen eine deutlich höhere Mortalität als die Steinbutts auf.)

Die Fische nahmen insgesamt nur unregelmäßig das angebotene Futter auf. Das Futter wurde zusammen mit den Fischen von der Fa. Butt beschafft (s.u.!), so daß es sich um das für die Fische gewohnte Futter handelte.

2.2. AUSGANGSMATERIAL

Die Grundbelastung mit PCBs des verwendeten gefilterten Meerwassers in den Versuchsbecken lag bei allen Stichproben unter 10 pg/l (Summe aller Kongenere).

Die verwendeten Steinbutts waren ca. 2-jährige, größtenteils juvenile Fische, die in der Bülker Anlage auf Längen zwischen 25 und 29 cm und Gewichte zwischen 300 und 500 g herangewachsen waren. (Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Längen und Gewichte der Fische jeder Versuchsserie sind im Ergebnisteil aufgeführt.) Alle Fische wurden mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn zur Eingewöhnung in die Versuchsbecken im IfM überführt.

Die Fische entstammten nur zu einem nicht bekannten Teil denselben Elterntieren, es handelte sich also nicht um genetisch einheitliches Material. Dies ist einerseits wegen der dadurch bedingten höheren Variabilität bedauerlich, andererseits entspricht es eher den natürlichen Gegebenheiten, die in Felduntersuchungen angetroffen werden.

Die Grundbelastung der Fische mit PCBs lag, wie Analysen von Stichproben ergaben, bei durchschnittlich 35 ng/g Leber und 16 ng/g Muskulatur (Gesamt-PCBs, bezogen auf das Feuchtgewicht. Die wesentlichsten Bestandteile, die in jeder untersuchten Stichprobe auftraten, waren die Kongenere 101, 118, 138, 170, 180 und 187. Dabei wurden die als besonders toxisch geltenden nicht ortho-substituierten Chlorbiphenyle 77, 126 und 169 in keinem Falle nachgewiesen.

Das für die Fische gewohnte Futter, das von der Fa. Butt bezogen wurde, wies eine Gesamtbelastung von weniger als 10 ng Σ PCBs / g extrahierbarer Lipide auf. Auch das marine Fischöl (für den pharmazeutischen Gebrauch), das in Bülk als Komponente dem Fischfutter beigemischt wurde, überstieg nicht diesen Wert.

Da die Fische nur sehr unregelmäßig das Futter annahmen, hätte eine definierte Kontaminierung über das Futter höchstens mittels einer Schlundsonde erfolgen können, was einen umso größeren Streß für die Tiere bedeutet hätte. Zudem lagen Erfahrungen aus den Niederlanden vor, daß Fische mit der Schlundsonde appliziertes, kontaminiertes Futter häufig erbrachen (DUINKER, pers. Mittlg). Aus diesem Grunde wurden den Versuchsfischen die Schadstoffe intraperitoneal injiziert. Dies ist ein gängiges Verfahren, das zudem eine genaue Dosierung ermöglicht. Wegen seiner relativ hohen Reinheit wurde das Fischöl als Träger (Lösungsmittel) für die intraperitoneale Injektion (s.u.) eingesetzt.

2.3 VORARBEITEN UND METHODEN ZUR MFO-BESTIMMUNG

Das MFO-System, das bisher besonders eingehend bei Warmblütern erforscht wurde, ist sehr labil, und es gibt bei der Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität diverse Möglichkeiten fataler Fehler. Die Erarbeitung bzw. Adaption der Methoden erforderte eingehende Literaturstudien und zahlreiche Vorversuche. Aus diesem Grunde nahm sie erheblich längere Zeit in Anspruch, als veranschlagt worden war. Zumal die dabei gesammelten methodologischen Erfahrungen ein wichtiges Ergebnis des Vorhabens darstellen, werden die Vorversuche und die für die Steinbuttleber optimierten und verwendeten Methoden hier ausführlicher dargestellt.

2.3.1 GRUNDSÄTZLICHES ZUR PROBENNAHME UND BEARBEITUNG

Wegen der Labilität des MFO-Systems sind grundsätzlich nur frisch getötete Tiere zu verwenden, und die Präparation der Leberprobe muß zügig bei tiefer Temperatur erfolgen.

Einige Autoren verwenden, insbesondere in Felduntersuchungen, in denen es ja kaum anders möglich wäre, in flüssigem Stickstoff schockgefrorene und anschließend bei mindestens -80°C konservierte Gewebeproben. Obwohl das MFO-System diese Lagerung für einige Zeit unbeschadet überstehen mag, wurde in diesem Verfahren, besonders in der Auftauphase vor der Weiterverarbeitung, die Gefahr von deutlichen Aktivitätsverlusten vermutet. Inzwischen verglichen MONOD & VINDIMIAN (1991) die Aktivität der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase in Fischleberproben, die entweder in kleine Scheiben geschnitten oder in Phosphatpuffer / 20 % Glycerin homogenisiert in flüssigem Stickstoff gelagert worden waren: die Aktivität der nur zerkleinerten Proben war gegenüber den mit Glycerin versetzten Homogenaten deutlich reduziert.

In diesem Vorhaben wurde es vorgezogen, grundsätzlich nur unmittelbar zuvor gewonnene Proben zu bearbeiten.

Sowohl im Institut für Meereskunde wie auch im Toxikologischen Institut wurden zur Tötung der Fische, Präparation der Leber bzw. weiteren Bearbeitung der Proben 4°C -Labors bereitgehalten, in denen alle verwendeten Geräte (Präparationsbestecke, Homogenisator, Reagenzgläser und andere Glasgefäße, Pasteurpipetten, Rotor und Gefäße der Ultrazentrifuge) und Pufferlösungen über Nacht temperiert worden waren.

Die Fische wurden nach ihrer Entnahme aus dem Becken durch einen Schlag auf den Schädel betäubt, durch Durchtrennung des Rückenmarks getötet, vermessen und gewogen. Bei der Herauspräparation der Leber wurde die Gallenblase mit besonderer Vorsicht entfernt, da eine Kontamination der Probe mit Gallenflüssigkeit die Aktivitätsbestimmungen erheblich gefährdet.

2.3.2. PRÄPARATION UND LAGERUNG DER MIKROSOMEN

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten setzt eigentlich die Isolierung des reinen Enzyms voraus. Im Falle des an die Membranen des endoplasmatischen Retikulum gebundenen MFO-Systems ist dies schwer möglich, da es nur in Verbindung mit den Bestandteilen der Membranen funktionsfähig ist. Darum wird üblicherweise nach der Homogenisation des Gewebes, während derer sich aus den Bruchstücken des ER zahlreiche kleine geschlossene Vesikel (Mikrosomen) bilden, zunächst die mikrosomale Fraktion gewonnen und zur Messung des Umsatzes eines geeigneten Substrates verwendet. Die spezifische Aktivität wird berechnet als die Produktmenge, die von 1 mg mikrosomalen Proteins in der Minute unter annähernd optimalen Bedingungen umgesetzt wird.

Das gängigste Verfahren zur Isolierung der Mikrosomen ist die Differentialzentrifugation des mit einem Puffer verdünnten Homogenats bei 4 °C Rotortemperatur in einer Ultrazentrifuge. Bei diesem Verfahren werden, jeweils in geeigneten Pufferlösungen, zunächst für 10 - 20 Minuten bei 10.000 - 12.000 * g die groben Zellbestandteile, wie Bruchstücke der Zellmembran, Zellkerne, Mitochondrien usw. ausgefällt. Die Pellets, die sich während der anschließenden einstündigen Zentrifugation des Überstandes, des post-mitochondrialen Überstandes, bei 100.000 - 120.000 * g am Boden des Zentrifugenrohres absetzen, bestehen überwiegend aus Mikrosomen. Das Pellet wird von vielen Autoren, so auch hier, in einem Puffer geringerer Dichte resuspendiert, und diese Suspension wird zur Reinigung nochmals für eine Stunde bei 100.000 - 120.000 * g zentrifugiert.

Die Verwendung eines Glycerin enthaltenden Puffers (s. Annex 1, Tab. 1.1) zur Resuspension des mikrosomalen Pellets erlaubt - ohne Aktivitätsverlust - eine Lagerung bei -80°C über mehrere Wochen (vgl. FÖRLIN & ANDERSSON, 1985). Somit war es möglich, die Mikrosomen einer Versuchsserie "aufzusparen" und die MFO-Aktivitäten dann parallel im direkten Vergleich zu bestimmen. Ohne Verwendung dieses Puffers ist die MFO-Aktivität schon am folgenden Tag deutlich reduziert.

Nachdem im Frühsommer 1989 eine enge Kooperation mit dem Toxikologischen Institut vereinbart und dessen Ultrazentrifuge instandgesetzt und dort für das Vorhaben bereitgestellt worden war, konnte diese Methode übernommen werden. Der Arbeitsablauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

Bis zu dieser Zusammenarbeit bereitete der Mangel des IfM Kiel an einer leistungsfähigen Ultrazentrifuge ernsthafte Probleme. (Mit der leistungsfähigsten Zentrifuge des Instituts ließen sich nur ca. 50.000 * g erreichen.) In dieser frühen Phase des Vorhabens wurde die von CINTI et al. (1972) entwickelte Methode der Präzipitation der Mikrosomen mit Ca^{2+} bei 35.000 * g versucht. Trotz genauester Befolgung der Beschreibung wurden nur sehr schlecht reproduzierbare Ergebnisse erzielt. Zwar wiesen CINTI et. al. (1972) darauf hin, daß sie ihre Methode nur an Rattenlebern getestet hatten, aber andere Autoren (z.B. AITIO & VAINIO, 1976) belegen im Grunde eine universellere Verwendbarkeit. Die Ursache der Fehlversuche ist daher unbekannt.

Eine Alternativmethode zur Isolierung der mikrosomalen Fraktion mittels Gel-Filtration (z. B. TANGEN et al., 1973) war hier zu dieser Zeit nicht bekannt und wurde deshalb nicht getestet.

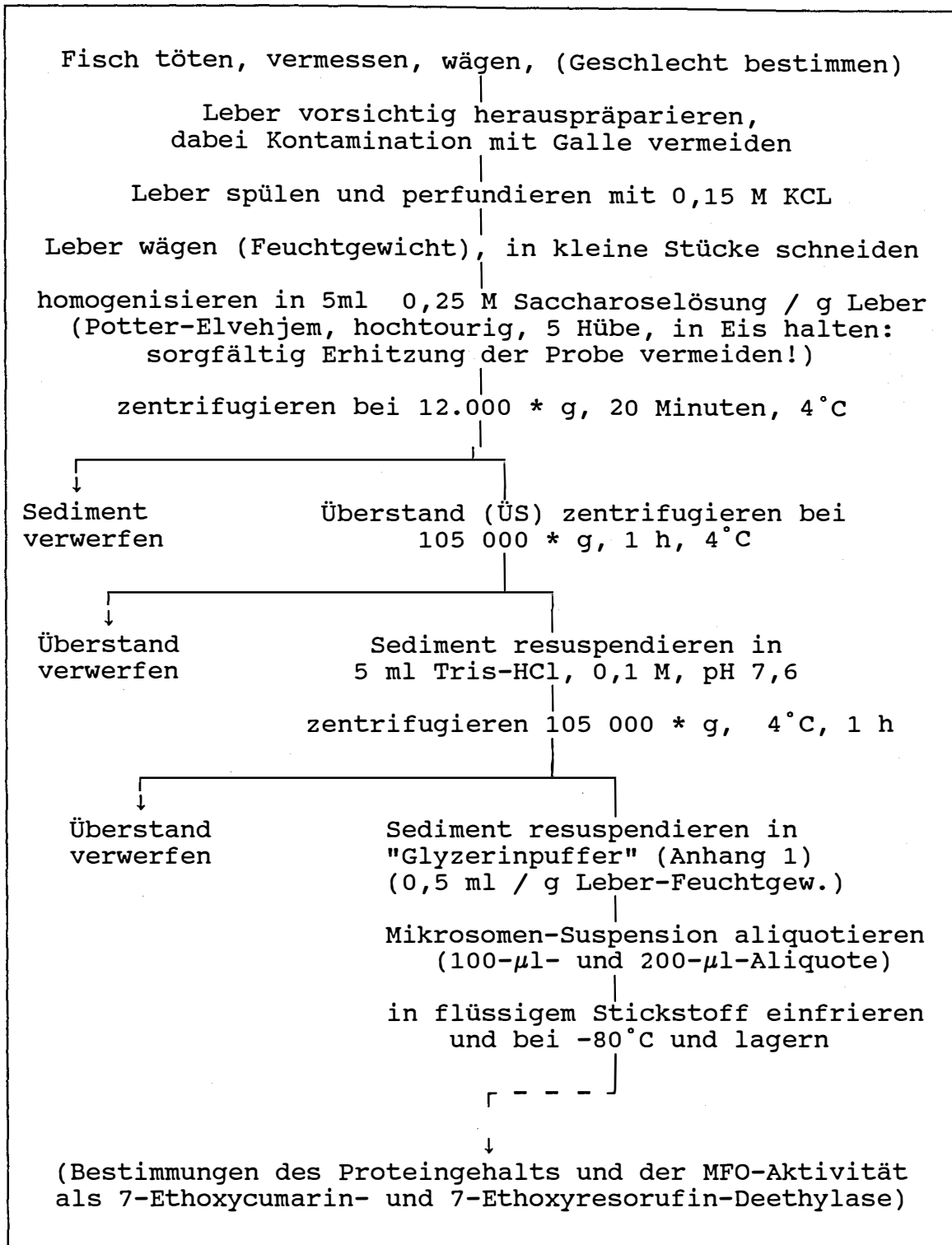


Abb. 1: Arbeitsgang zur Gewinnung der Mikrosomen-Suspension (vollständig bei 0-4°C auszuführen)

Eine besonders in Felduntersuchungen verwendete Alternativmethode zur Bestimmung von spezifischen Monooxygenase-Aktivitäten, die Bestimmung im postmitochondrialen Überstand (s.o.!), wurde für dieses Vorhaben nicht erwogen, weil dieser Überstand auch nicht-mikrosomale Proteine enthält.

2.3.3 PROTEINGEHALT DER MIKROSOMEN-SUSPENSION

Nach internationaler Konvention wird die Enzymaktivität durch die auf das Gewicht oder Volumen bezogene Aktivitätseinheit ausgedrückt: Eine Einheit (U) ist diejenige Enzymaktivität (nicht Menge!), welche unter möglichst optimalen Meßbedingungen in 1 min 1 μ Mol Substrat umsetzt.

Wenn, wie hier, bei der Bestimmung nicht das umgesetzte Substrat, sondern der entstandene Metabolit gemessen wird, so wird üblicherweise die spezifische Aktivität in μ Mol pro min angegeben. Als Bezugsgröße für die spezifische Aktivität von hepatischen Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen verwenden einige Autoren die Feuchtgewichtseinheit der eingesetzten Leber, andere beziehen auf μ Mol Cytochrom-P450, wobei dieses noch genauer spezifiziert sein kann. Die Mehrheit der Autoren verwendet jedoch als Bezugsgröße das mg mikrosomalen Proteins im Versuchsansatz. Aus Gründen der Praktikabilität und der Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde diese Bezugsgröße übernommen. Somit ergab sich die Notwendigkeit der Bestimmung des Proteingehalts der Mikrosomen-Suspension.

Als Bestimmungsmethode wurde die Methode von BRADFORD (1976) übernommen, wie sie z.B. als detaillierte Gebrauchsanweisung für den Analysen-Kit der Fa. Bio-Rad vorliegt. Die Methode bedurfte keiner weiteren Einarbeitung, und die Ergebnisse sind mit denen nach anderen anerkannten Methoden (Lowry, Biuret) vergleichbar.

2.3.4. MESSUNG DER MONOOXYGENASE-AKTIVITÄTEN

Traditionell wird die MFO-Induktion durch Pharmaka bzw. Xenobiotika untergliedert in einen PAH-Typ, zumeist 3-Methylcholanthren-(3-MC)-Typ genannt, und in einen Barbiturat-Typ, zumeist Phenobarbital-(PB)-Typ genannt (vgl. HAUX & FÖRLIN, 1990; Wellhöner, 1990). Die Induktion des 3-MC-Typs kann recht spezifisch als erhöhte 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-(EROD)-Aktivität, die des PB-Typs als erhöhte 7-Ethoxycumarin-O-deethylase-(ECOD)-Aktivität gemessen werden.

Einige Verbindungen, wie auch einige PCB-Kongenere, induzieren (zumindest im Säugereperiment) beide durch diese Grundtypen charakterisierten Monooxygenasen-Systeme ("Misch-Typ"). Ein in Experimenten häufig verwendeter Vertreter des Misch-Typs ist das β -Naphthoflavon (BNF, β -NF).

In diesem Vorhaben sollten die Reaktionen der EROD und der ECOD auf ausgewählte Chlorbiphenyle getestet werden. Während der Optimierung der Methoden wurde einzelnen Fischen 3-5 Tage vor der Mikrosomen-Präparation in Speiseöl gelöstes β -NF (100mg/ml) intraperitoneal injiziert (100 mg β -NF/kg = 1 ml Öl/ kg Körpergewicht), um die MFO-Aktivitäten zu erhöhen.

2.3.4.1 MESSUNG DER 7-ETHOXYCUMARIN-O-DEETHYLASE-AKTIVITÄT

Alle bisher bekannten Methoden der ECOD-Bestimmung basieren darauf, daß Mikrosomen-Suspension in einem geeigneten Puffer bei optimaler Temperatur für eine definierte Zeitspanne mit NADPH bzw. einem NADPH-regenerierenden System und dem Substrat 7-Ethoxycumarin versetzt und der nach einem definierten Zeitraum entstandene Metabolit (Produkt), das 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon), fluorimetrisch gemessen wird.

Da nach der Inkubation sowohl das Substrat (7-Ethoxycumarin) wie das Produkt (Umbelliferon) im Ansatz vorhanden sind, die beide fluoreszieren, wurden zunächst Excitations- und Emissionsspektren von Lösungen beider Substanzen aufgenommen. Dadurch wurde ermittelt, daß (bei pH 10,3) bei einer Excitationswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm das Umbelliferon im Maximalbereich emittiert, während das 7-Ethoxycumarin dort fast kein Signal hervorruft.

In der ersten Jahreshälfte wurden zahlreiche (fehlgeschlagene) Versuche unternommen, die von PROUGH et al. (1978) beschriebene direkte Bestimmungsmethode (Enzym-Ansatz in der fluorimetrischen Küvette) zu übernehmen. Es ist nachträglich sehr wahrscheinlich, daß die Fehlschläge nicht auf die Methode von PROUGH et al. (1978), sondern auf die zu dieser Zeit noch unzureichende Mikrosomen-Präparation zurückgeführt werden müssen.

Zunächst ebenfalls fehlgeschlagene Versuche mit der von PALSSON (1981) modifizierten Methode von AITIO (1978) erbrachten im Grundsatz sinnvolle Ergebnisse, sobald Mikrosomensuspensionen nach der in Abbildung 1 beschriebenen Methode verwendet wurden.

Da PALSSON mit Ratten gearbeitet hatte, und da mit artspezifischen Unterschieden in den optimalen Bedingungen für die Enzymbestimmung zu rechnen war, wurden diese für die Steinbuttleber überprüft und angepaßt. Der schließlich verwendete, hinsichtlich Temperatur, pH sowie Konzentrationen an mikrosomalem Protein und Substrat optimierte Ansatz zur Bestimmung der ECOD-Aktivität ist in Abbildung 2 dargestellt.

<u>(in Eis ansetzen!)</u>	Probe	Blank
NADPH-regenerier. System (RS)	200 μ l	200 μ l
Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6	200 μ l	200 μ l
7-Ethoxycumarin, 1 mM	50 μ l	50 μ l
▶▶ mischen, 5 min auf 30°C vorwärmen		
Mikrosomen-Suspension (MS) (10 mg mikrosom. Prot. / ml)	50 μ l	-
▶▶ mischen, 10 min bei 30°C inkubieren		
Trichloressigsäure (TCA) 5%, 4°C	500 μ l	500 μ l
Mikrosomen-Suspension (s.o.!)	-	50 μ l
▶▶ (hier Unterbrechung für mehrere Stunden möglich, dazu im Kühlschrank aufbewahren!)		
Tris-Puffer, pH 10,3	4 ml	4 ml
▶▶ mischen, 10 Min 20°C 3000 UPM zentrifugieren; sofort im Fluorometer messen! (Excitation 380 nm, Emission 460 nm) Umbelliferon ist bei pH 10,3 instabil!		
Eichen mit 7-Hydroxycumarin-Standard (1,5 μ M/l = 100% relative Fluoreszenz)		

Abb. 2: Inkubations-Ansatz zur Bestimmung der Aktivität der 7-Ethoxycumarin-deethylase (ECOD), modifiziert nach AITIO (1978) und PALSSON (1981)

Die Reagenzien und deren Lösungen (wie das NADPH-regenerierende System), die schließlich für die ECOD-Bestimmung verwendet wurden, sind in Annex 1, Tab. 1.2 aufgelistet. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche zur Methodenoptimierung wurden ausführlich im Zwischenbericht 1989 dargestellt.

2.3.4.2 MESSUNG DER 7-ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE-AKTIVITÄT

Außer der von KLOTZ et al. (1984) beschriebenen spektralphotometrischen Methode basieren auch alle bisher bekannten Methoden zur EROD-Bestimmung auf der fluorimetrischen Bestimmung des Metaboliten, Resorufin. Auch für dieses Substrat (7-Ethoxyresorufin) und seinen Metaboliten (Resorufin) wurden zunächst die Excitations- und Emissionsspektren aufgenommen. Als günstigste Wellenlängeneinstellung wurde für die Excitation 550 nm und für die Emission 585 nm ermittelt, da bei diesen Wellenlängen das Resorufin im Maximalbereich emittiert, während das 7-Ethoxyresorufin dort kaum fluoresziert.

Für die Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität wurden im ersten Halbjahr zahlreiche fehlgeschlagene Versuche unternommen, die von BURKE & MAYER (1974) und in leicht modifizierter Form von PROUGH et al. (1978) beschriebene direkte Bestimmungsmethode zu übernehmen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Fehlschläge auf die zu der Zeit unzureichende Mikrosomenpräparation zurückgeführt werden müssen.

Wie im Falle der ECOD-Bestimmung, so wurde eine EROD-Aktivität prinzipiell erkennbar, sobald Mikrosomen-suspensionen verwendet wurden, die nach dem in Abbildung 1 dargestellten Schema zubereitet worden waren. Die Methode zur Bestimmung der EROD-Aktivität wurde von POHL & FOUTS (1980) übernommen, durch Teilkomponenten von PALSSON (1981) modifiziert und für die Steinbuttleber optimiert. Abbildung 3 zeigt das Schema des schließlich angewendeten Bestimmungsansatzes.

In Annex 1, Tab. 1.3 sind die Reagenzien und deren Lösungen aufgelistet, die für die EROD-Bestimmung verwendet wurden. Probleme bereitet die Tatsache, daß das 7-Ethoxyresorufin nahezu unlöslich in wässriger Lösung ist. Deshalb wird die Stammlösung üblicherweise in Ethanol angesetzt, und das Substrat wird mit Ethanol in den Inkubationsansatz eingebracht; dabei ist ein Minimum an Alkohol notwendig, damit das Substrat nicht spontan ausfällt. Leider hemmt Ethanol jedoch die EROD, so daß die Ethanol-Konzentration im Ansatz auf das absolut nötige Minimum zu begrenzen ist.

Reagenzien (kühl ansetzen!)	Probe	Blind- probe	Konz. im ml Ansatz
Glucose-6-Phosphat (0,1 M)	50 μ l	50 μ l	5 mM
Natrium-Phosphat- Puffer, pH 7,8	ad 1 ml	ad 1 ml	
Glucose-6-Phosphat-D Dehydrogenase, 1,75 U	10 μ l	10 μ l	1,75 U
Ethoxyresorufin in Äthanol (15 μ M)	25 μ l	25 μ l	375 nM
Mikrosomen (10 mg/ml Prot)	10 μ l	10 μ l	100 μ g
5 Min. bei 30°C auf Inkubationstemperatur bringen!			
NADPH (1 mM)	10 μ l	---	10 μ M
mischen ↓ 10 Min. bei 30°C inkubieren ↓ mit 2,5 ml Methanol vermischen			
NADPH (1 mM)	---	10 μ l	10 μ M
mischen zentrifugieren 10 Min., 20 C, 3000 UPM messen be Ext. 550nm, Emiss. 585 nm eichen mit 1 μ M Resorufin = 100 % Eichkurve immer vorher messen!			

Abb. 3: Inkubationsansatz zur Bestimmung der Aktivität der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), modifiziert nach POHL & FOUTS (1980) und PALSSON (1981)

2.4 VERSUCHE UND VERSUCHSBEDINGUNGEN

Es ist bekannt, daß die Aktivität von hepatischen Monoxygenasen der Fische u.a. von der Wassertemperatur und vom Ernährungszustand beeinflusst werden kann (ANDERSSON & KOIVUSAARI, 1985; ANKLEY & BLAZER, 1988; JIMENEZ et al., 1988a,b, 1989), Da sich schon die Wassertemperatur in der bestehenden Aquarienanlage nicht von Versuch zu Versuch konstant halten ließ (die Temperaturen und Salinitäten während der Versuche sind in den Versuchsbeschreibungen aufgeführt), und da die Fische das angebotene Futter sehr ungleichmäßig aufnahmen, wurde bei den Versuchen parallel je eine Gruppe mit β -Naphthoflavon und dem reinen, sonst als Chlorbiphenyl- bzw β -Naphthoflavon-Träger eingesetzten Fischöl beimpft. Damit sollte ein Vergleich zwischen den einzelnen Versuchen ermöglicht werden.

Wie unter 2.3.1 begründet wurde, konnten zur Aktivitätsbestimmung nur Lebern unmittelbar zuvor getöteter Tiere verwendet werden, aus denen schnellstmöglich die mikrosomale Fraktion zu isolieren war. Es wurde eine Zeitspanne von maximal 2 h von der Tötung des 1. Tieres bis zur Zentrifugation aller Homogenate eines Versuchstages eingehalten. Deshalb konnten pro Tag maximal 4 Tiere bearbeitet werden, eine für die statistische Auswertung problematisch geringe Anzahl.

2.4.1 VERSUCH "ÖLE"

Von vielen Autoren wurde in vergleichbaren Versuchen als Träger (Lösungsmittel) für den MFO-Induktor (bei dem es sich in aller Regel um eine hochgradig hydrophobe Substanz handelt), ein pflanzliches Öl verwendet, fast ausnahmslos Maisöl (corn oil). Hier stand das Fischöl marinen Ursprungs relativ hoher Rückstandsfreiheit (s.o.) zur Verfügung, und es bot sich an, dieses Öl als Träger zu verwenden. Es wurde davon ausgegangen, daß ein Fischöl von seiner Zusammensetzung her besser für die Resorption aus der Leibeshöhle in den Fischkörper hinein geeignet sein könnte als ein Öl pflanzlichen Ursprungs. Eine rasche, vollständige Resorption des Öles ist für den Versuch unabdingbare Voraussetzung, weil der in die Leibeshöhle injizierte MFO-Induktor andernfalls nur langsam aus dem Öl in das Gewebe diffundieren würde. Andererseits birgt die Verwendung von Fischöl mit seinen enthaltenen Verbindungen angesichts der zentralen Rolle des Cytochrom P₄₅₀-Systems im Stoffwechsel vieler endogener Substrate (z.B. Steroide) die Gefahr, daß dieses Öl evtl. selbst massiv auf die Aktivität des MFO-Systems und seine Reaktion auf Xenobiotika einwirken könnte.

Im letzten Vorversuch, zugleich dem ersten Parallelversuch mit mehreren Fischen, sollte deshalb geprüft werden, ob die Applikation des reinen Fischöls die Aktivitäten der beiden Monoxygenasen relativ zu unbehandelten Kontrollen beeinflusst, und ob die eventuelle Beeinflussung mit derjenigen durch ein pflanzliches Speiseöl (Distelöl "aus kontrolliert biologischem Anbau", Fa. Rapunzel) vergleichbar ist.

Je 4 Tieren wurde dazu jeweils 1 ml Fischöl/kg Steinbutt bzw. 1 ml Distelöl/kg Steinbutt intraperitoneal appliziert. Beide Gruppen wurden zusammen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe von 4 Tieren nach 5 Tagen untersucht. Diese Versuchsdauer wurde gewählt, weil sie nach der Literatur in Versuchen zur MFO-Induktion allgemein verwendet wurde. Die Tiere waren über ca. 3 Monate an die Versuchsaquarien adaptiert. Während des Versuchs lag die Wassertemperatur im Mittel bei 13,3 (\pm 0.9) °C und die Salinität bei S = 14,7 (\pm 0,6).

2.4.2 VERSUCH "CB 77/1"

Nachdem alle Bestimmungsmethoden erarbeitet und an einzelnen Proben optimiert waren, sollten sie in einem ersten Versuch unter Routinebedingungen angewendet und erprobt werden. Um ggf. nicht unnötig viele Fische für einen Fehlversuch zu opfern, wurde nur jeweils 1 Fisch pro Zeitpunkt und Ansatz entnommen.

Mit diesem Versuch sollte eine Vorstellung über die Toxokinetik, speziell den zeitlichen Verlauf des Auftretens der Verbindung in der Leber gewonnen werden. Es war unsicher, ob das injizierte Fischöl sehr schnell aus der Leibeshöhle resorbiert oder ob es dort längere Zeit verbleiben würde. Im letzteren Falle war damit zu rechnen, daß auch das Chlorbiphenyl längere Zeit im Öl, seinem Lösungsmittel, verbleiben würde, ohne in die Gewebe zu diffundieren (s.o.). Es bot sich an, den Versuch mit einem Chlorbiphenyl durchzuführen, dessen enzyminduzierende Wirkung an Fischen bereits gut belegt war.

Nach einer umfassenden Übersicht von KLEINOW et al. (1987) haben bisher nur wenige Arbeiten eine Induktion des PB-Typs in Fischen durch PCB-Kongenere nachweisen können. Es lag also nahe, für diesen Versuch einen sicheren Induktor des 3-MC-Typs zu verwenden, ein nicht ortho-substituiertes, zur koplanaren Konfiguration befähigtes PCB.

Aus mehreren pragmatischen Gründen wurde für den Versuch das Chlorbiphenyl 77 (IUPAC-Nr.), also 3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl, ausgewählt:

- aus Sicherheitsgründen, da diese Verbindung unter den drei nicht ortho-substituierten Chlorbiphenylen als für den Menschen relativ harmloseste, leichtest eliminierbare gilt;
- es spielt in den meisten technischen PCB-Gemischen (vgl. SCHULTZ et al., 1989) und Umweltproben (vgl. McFARLAND & CLARKE, 1989) unter den planaren Kongeneren die mengenmäßig größte Rolle; (es muß jedoch daran erinnert werden, daß das CB Nr. 77 weder in den Steinbutts noch in einer der Wasser- oder Futterproben nachgewiesen wurde (s.o.);
- es waren gerade zwei Arbeiten von erschienen, die die MFO-induzierende Wirkung insbesondere des CB Nr. 77 in einem marinen Fisch (Stenotomus chrysops) zum Thema hatten (GOOCH et al., 1989a,b);
- zufällig stand diese Verbindung in der größten Menge (100 mg) zur Verfügung, da jeweils die kleinste Verpackungseinheit einiger ausgewählter Verbindungen beschafft worden war.

GOOCH et al. (1989a) hatten ihren Versuchsfischen Chlorbiphenyl-Dosen von 100 µg bis 10 mg/kg Fisch intraperitoneal verabreicht und gefunden, daß die 100 µg-Dosis die maximale EROD-Induktion zur Folge hatte, während bei den hohen Dosen eine Hemmung auftrat. Deshalb wurde die zu injizierende Dosis für diesen Versuch auf 50 µg/kg Fischgewicht festgesetzt.

GOOCH et al. (1989a,b) hatten ihren Versuchsfischen nach 5 Tagen die Leber entnommen. Andere Autoren arbeiteten, ohne die Versuchsdauer zu begründen, mit Versuchszeiten zwischen 3 und 7 Tagen. Dadurch werden Vergleiche erschwert. Wenn die maximale Induktion (bzw. Hemmung) verschiedener Verbindungen erfaßt werden soll, so muß die Beprobungszeit an der spezifischen Kinetik des Fremdstoffes orientiert werden. FÖRLIN et al. (1984) und ANDERSSON & KOIVUSAARI (1985) ermittelten den zeitlichen Verlauf der MFO-Aktivitäten in der Forellenleber nach Verabreichung von β-Naphthoflavin. Danach erreichten die ECOD- und die EROD-Aktivität ihre Maxima zwischen 3 und 7 Tagen; die zeitliche Entwicklung der β-NF-Gehalte wurde dabei jedoch nicht ermittelt. Deshalb sollte in diesem Versuch über ca. einen Monat die Entwicklung der 3,3',4,4'-TCB Gehalte und der MFO-Aktivitäten verfolgt werden. Es wurde davon ausgegangen, daß das Induktionsmaximum zwischen 3 und 7 Tagen liegen dürfte, so daß in dieser Zeitspanne die Beprobungsfrequenz am höchsten angesetzt wurde.

Die verwendeten Steinbutts waren über 3 Monate an die Versuchsaquarien gewöhnt worden. Die Temperatur variierte während der Versuchsdauer zwischen 6,0 und 10,3 °C (Mittelwert 8,4 °C) und die Salinität zwischen 16,5 und 19,2 (Mittelwert 18,5).

Bei diesem Versuch ergab sich auch die Gelegenheit, die Cortisolspiegel im Blutserum mittels RIA zu bestimmen. Da Cortisol als Steroidhormon in enger Wechselbeziehung mit dem MFO-System steht, wurde diese Gelegenheit wahrgenommen. Dieses Hormon spielt in Fischen, zusätzlich zu seinen vielfältigen Funktionen in allen Wirbeltieren, auch eine wichtige Rolle in der Steuerung der Osmoregulation.

2.4.3 VERSUCH "CB 77/2"

Die Ergebnisse des obigen Versuches (s.u.) machten es notwendig, den Versuch mit erhöhter Dosis (100 µg CB 77/kg Fischgewicht und mit höherer Anzahl von Versuchstieren (jeweils 4 Tiere pro Behandlung und Versuchsdauer) zu wiederholen.

Da das Induktionsmaximum nach 3 - 5 Tagen erwartet wurde, wurden diese Versuchsdauern gewählt. Die zusätzliche Probenahme nach schon einem Tag wurde durchgeführt, weil durch den Kooperationspartner (Elnabawi, Toxikologisches Institut) am gleichen Material die Aktivitäten der K^+ , Na^+ - und Mg^{2+} -ATPasen in Kiemen und Gehirn bestimmt werden sollten; die ATPasen sprechen bereits innerhalb der ersten Stunde, auf die Behandlung an (Elnabawi, pers. Mittlg).

Erst bei der Öffnung der Leibeshöhlen zur Präparation der Gewebe wurde deutlich, daß drei der Steinbutts fast fließend reife Ovarien entwickelt hatten; zufällig war dies nach den drei Versuchsdauern bei jeweils einem der mit Chlorbiphenyl Nr. 77 beimpften Tiere der Fall.

Dieser Versuch wurde in der zweiten Julihälfte 1990 durchgeführt, und die Tiere waren über mehr als 3 Monate an die Halterungsbecken adaptiert, also wegen ihrer sehr unregelmäßigen Annahme des Futters in einem recht schlechten Ernährungszustand. Während des Versuchszeitraumes stieg die Wassertemperatur langsam und kontinuierlich von 15,5 auf 16,7 °C, während die Salinität nur geringfügig zwischen 14,2 und 14,5 schwankte.

2.4.4 VERSUCH "3 CBs"

Mit diesem letzten im Projektzeitraum möglichen Versuch sollte parallel die Reaktion der beiden Monooxygenasen (EROD und ECOD) auf drei unterschiedliche Chlorbiphenyle studiert werden.

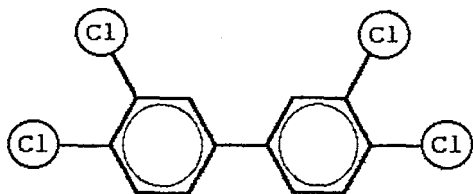
Zur Auswahl der zu applizierenden Kongenere wurde die Arbeit von McFARLAND & CLARKE (1989) herangezogen. Diese Autoren hatten aus umfangreichen Datensätzen über das Vorkommen von Chlorbiphenyl-Kongeneren in marinen Umweltproben und über ihre Toxizitäten eine Prioritätenliste für das PCB-Monitoring zusammengestellt und vorgeschlagen.

Die höchste Priorität kommt demnach aufgrund ihrer hohen Toxizität den nicht ortho-substituierten Kongeneren zu, obwohl sie in Umweltproben selten nachgewiesen wurden. Diese Gruppe umfaßt Induktoren des reinen 3-Methylcholanthren-Typs (s. 2.3.4). Von diesen Verbindungen gilt IUPAC-Nr. 77 als die in Umweltproben verbreitetste.

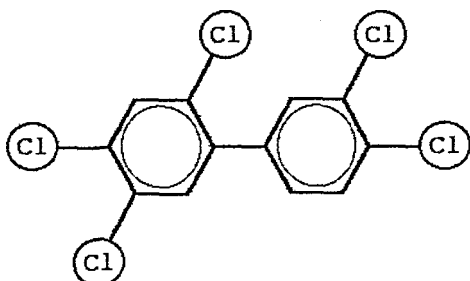
In die nächste Gruppe ordnen McFARLAND & CLARKE die Kongenere 105, 118, 128, 138, 156 und 170, die in marinen Organismen relativ oft in nennenswerten Konzentrationen nachgewiesen wurden und die als Induktoren des Misch-Typs gelten. Für diesen Versuch wurde das monoortho-substituierte Chlorbiphenyl Nr. 118 (2,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl) wegen seiner neben Nr. 105 größten strukturellen Ähnlichkeit mit Nr. 77 ausgewählt; die anderen Verbindungen dieser Gruppe sind Hexa- und Heptachlorbiphenyle.

Die nächste Priorität geben obige Autoren den Kongeneren Nr. 87, 99, 101, 153, 180, 183 und 194. Diese Verbindungen gelten als MFO-Induktoren des Phenobarbital-Typs, die zugleich relativ oft und in relativ hohen Konzentrationen in Umweltproben nachgewiesen wurden. Unter diesen Verbindungen wurde das Chlorbiphenyl Nr. 153 (2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl) als diortho-substituierte ausgewählt. (Neben CB Nr. 138 ist CB 153 das quantitativ wichtigste Chlorbiphenyl in antarktischen Robben und Vögeln (SCHNEIDER, eingereichtes Manuskript)).

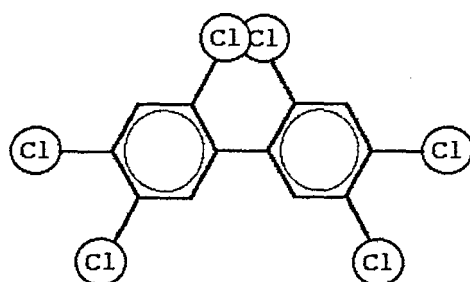
Die Strukturformeln der drei ausgewählten Chlorbiphenyle sind in Abb. 4 dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß sich diese Kongenere nur in der Anzahl der in der ortho-Position substituierten Chloratome unterscheiden. Die Überlagerung der beiden Chloratome in ortho-Position am CB 153 verdeutlicht die sterische Behinderung der freien Rotation der Phenylreste um die Achse ihrer gemeinsamen Bindung, die Behinderung der koplanaren Konfiguration des Moleküls.



a) 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (CB 77)



b) 2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (CB 118)



c) 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (CB 153)

Abb. 4: Struktur der im Versuch "3 CBs" hinsichtlich ihrer MFO-Induktion verglichenen drei Chlorbiphenyle. (Weder die Bindungslänge noch der Durchmesser der Chloratome sind maßstabsgetreu zum Phenylrest.)

Datum	Injektion	Präparation der Lebern und der mikrosomalen Fraktion nach	
		1 Tag	7 Tagen
Mo, 01.10.90	CB 118 8 Fische	(4 unbehandelte Tiere, 0 Tage) (0 - Kontrolle)	
Di, 02.10.90	CB 77 8 Fische	CB 118 4 Fische	
Mi, 03.10.90	CB 153 8 Fische	CB 77 4 Fische	
Do, 04.10.90	Fischöl 8 Fische	CB 153 4 Fische	
Fr, 05.10.90	β-NF 4 Fische	Fischöl 4 Fische	
Sa, 06.10.90			
So, 07.10.90			
Mo, 08.10.90			CB 118 4 Fische
Di, 09.10.90			CB 77 4 Fische
Mi, 10.10.90			CB 153 4 Fische
Do, 11.10.90			Fischöl 4 Fische
.Fr, 12.10.90			β-NF 4 Fische

Abb. 5: Zeitlicher Ablauf des Versuchs "3 CBs"

Da maximal 4 Tiere pro Tag aufgearbeitet werden konnten, mußte der Versuchsansatz zeitlich gestaffelt werden; Abb. 5 zeigt den Zeitplan.

Die verwendeten Fische waren 2 Wochen vor Versuchsbeginn aus Bülk geholt und seitdem an die Versuchsbecken adaptiert worden. Wegen dieser im Vergleich zu den anderen Versuchen relativ kurzen Hälterung im IfM kann angenommen werden, daß diese Tiere vergleichsweise einheitlich und gut genährt waren. Während der Versuchsdauer sank die Temperatur kontinuierlich von 14,3 auf 13,4 °C (im Mittel 13,9 °C), und die Salinität schwankte zwischen 14,7 und 16,1 (im Mittel 15,5).

2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die Daten aller einheitlich behandelten und zum gleichen Zeitpunkt getöteten Tiere wurden die arithmetrischen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Diese sind zwar streng genommen nur für Normalverteilungen charakteristisch, die Standardabweichung kann jedoch nach SACHS (1978) als allgemeines, von der Normalverteilung unabhängiges Streuungsmaß dienen. (Für den letzten Versuch, "3 CBS", wurden zusätzlich die geometrischen Mittel errechnet und graphisch dargestellt. Die Unterschiede zwischen den arithmetrischen und den geometrischen Mittelwerten betragen bei den Monooxygenase-Aktivitäten bis zu ca. 20 %.)

Aus methodischen Gründen (s. 2.4) mußte die Gruppengröße auf jeweils 4 Tiere beschränkt bleiben. Durch diese geringe Zahl von Meßwerten bedingt, wäre eine Angabe statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen ohnehin nur bei hohen Irrtumswahrscheinlichkeiten möglich. Zudem weisen teilweise erhebliche individuelle Unterschiede innerhalb einzelner Versuchstiergruppen auf möglicherweise physiologisch bedingte statistische Ausreißer hin (s. 3.1), d.h. einzelne Tiere sind möglicherweise gar nicht mit den anderen vergleichbar. Es erscheint wenig sinnvoll, angesichts der geringen Anzahlen Ausreißer zu eliminieren, um auf die dann noch geringeren Anzahlen statistische Vergleichsverfahren anzuwenden. Diese Problematik verdeutlichen z.B. die ECOD-Aktivitäten [pMol / mg Protein * min] der mit Fischöl beimpften Tiere im Versuch "Öle" (Tab. 2.1, Annex 2), von denen 50 % als statistische Ausreißer zu behandeln wären.

Aus diesen Gründen beschränken sich Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen in der nachfolgenden Diskussion der Ergebnisse auf den Vergleich der Position der Mittelwerte und auf das Kriterium, ob sich die Bereiche der 1-fachen Standardabweichungen vom Mittelwert überschneiden. Wenn sich die Bereiche nicht überschneiden, wird im Folgenden ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen angenommen.

3. ERGEBNISSE

3.1. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES VERSUCHS "ÖLE"

Die einzelnen Meßwerte sind in Tab. 2.1 (Annex 2) ausgedruckt. In Abb. 6a und b sind zur Charakterisierung der jeweils 4 unbehandelten bzw. mit Fischöl oder Distelöl beimpften Fische die arithmetischen Mittel und Standardabweichungen ihrer Längen und Gewichte sowie ihrer Lebergewichte und Leber-Somatischen Indices zusammengefaßt. Während die Längen der Fische aller drei Gruppen recht identisch waren, deutet sich eine Tendenz zu einem höheren mittleren Gewicht, also einem höheren Konditionsfaktor der beiden beimpften Gruppen an. Über den Versuchszeitraum war keine Veränderung der Längen und Gewichte meßbar; deshalb können etwaige Unterschiede nicht auf die Beimpfung zurückgeführt werden.

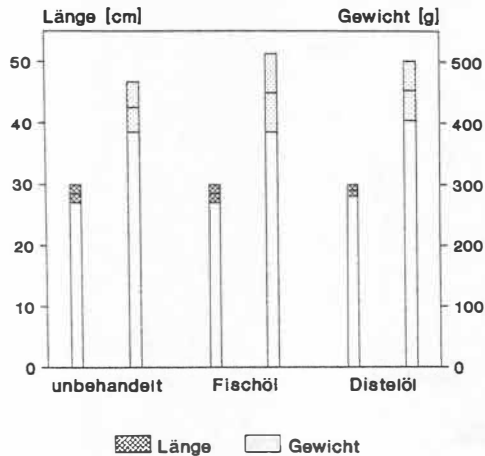
Die Lebergewichte der mit den Ölen beimpften Tiere lagen im Mittel unterhalb derer der unbehandelten Kontrollen. Höhere Lebergewichte bei geringeren Konditionsfaktoren sind plausibel, weil bekannt ist, daß Hunger zur Leberverfettung führen kann. Es kann also angenommen werden, daß die behandelten Gruppen im Mittel geringfügig besser genährt waren. Auch der Vergleich der Leber-Somatischen Indices zeigt keinen ausgeprägten Unterschied.

Tendenziell lagen die Gehalte der Leber an mikrosomalem Protein (Abb. 6c) in den unbehandelten Kontrollen etwas höher als in den beimpften Tieren, deren Mittelwerte untereinander gleich waren. ANDERSSON et al. (1985) fanden zwischen den Gehalten der Leber von gefütterten und ungefütterten Regenbogenforellen an mikrosomalem Protein einen signifikanten Unterschied, dieser trat jedoch erst nach 12 Wochen auf, während nach 6 Wochen noch kein Unterschied festzustellen war. Da die Steinbutts untereinander das gleiche Nahrungsangebot gehabt hatten, überrascht die hier in den Mittelwerten angedeutete Tendenz. Der Vergleich der Streubereiche weist jedoch nicht auf einen wirklichen Unterschied zwischen den drei Gruppen hin.

In Abb. 6d sind die auf mikrosomales Protein bezogenen ECOD- und EROD-Aktivitäten nebeneinandergestellt. Während die EROD-Aktivitäten relativ einheitlich sind, zeichnet sich ein deutlicher Unterschied zwischen den ECOD-Aktivitäten ab: Sie lagen in der Kontrollgruppe deutlich höher als in der mit Fischöl beimpften Gruppe. Aus Tab. 2.1 ist ersichtlich, daß dieser Unterschied besonders durch zwei mit Fischöl beimpfte Fische hervorgerufen wird, von denen einer auch eine besonders niedrige EROD-Aktivität aufwies.

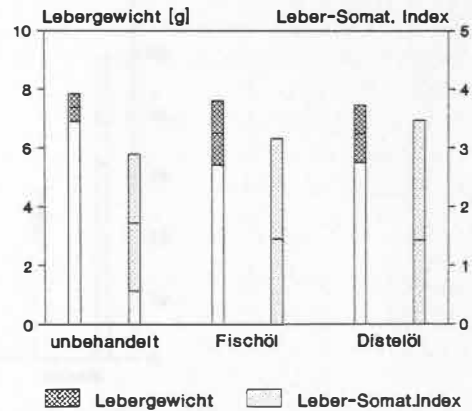
Versuch "Öle" / Körpermaße und Ergebnisse-1

a) Länge und Gewicht der Fische
(Mittelwerte und Standardabweichungen
von jeweils 4 Fischen / Gruppe)



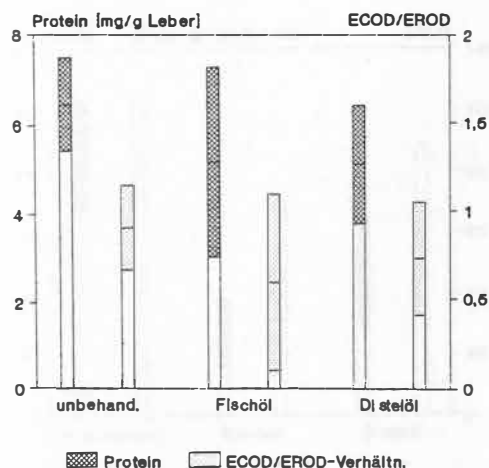
Versuch "Öle":
je 1 ml Fischöl bzw. Distelöl / kg Fisch
unbehandelte Kontrollgruppe, 5 Tage

b) Lebergewicht und LSI
(Mittelwerte und Standardabweichungen
von jeweils 4 Fischen / Gruppe)



Versuch "Öle":
je 1 ml Fischöl bzw. Distelöl / kg Fisch
unbehandelte Kontrollgruppe, 5 Tage

c) mikros. Protein und ECOD/EROD
(Mittelwerte und Standardabweichungen
von jeweils 4 Fischen / Gruppe)

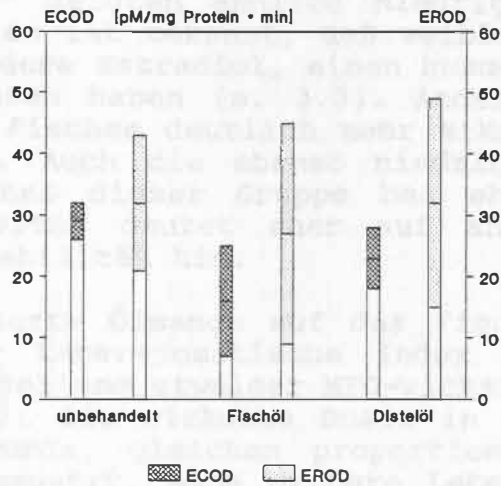


Versuch "Öle":
je 1 ml Fischöl bzw. Distelöl / kg Fisch
unbehandelte Kontrollgruppe, 5 Tage

Abb. 6 (a-c): Längen und Gewichte, Lebergewichte und Leber-Somatische Indices sowie Gehalt der Leber an mikrosomalem Protein und ECOD/EROD - Verhältnis von je 4 Steinbutts im Versuch "Öle"

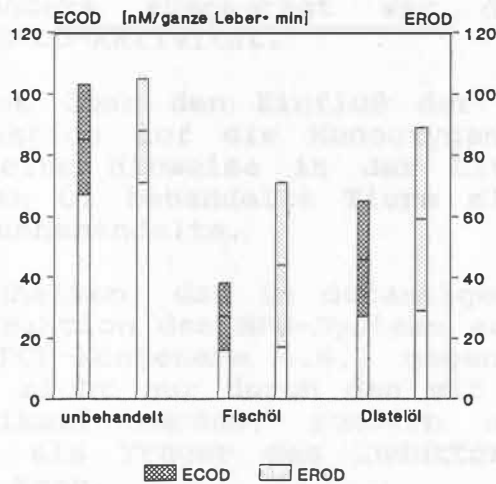
Versuch "Öle" / Ergebnisse-2

d) ECOD und EROD (Protein-bez.)
(Mittelwerte und Standardabweichungen
von jeweils 4 Fischen / Gruppe)



Versuch "Öle":
je 1 ml Fischöl bzw. Distelöl / kg Fisch
unbehandelte Kontrollgruppe, 6 Tage

e) ECOD und EROD (ganze Leber)
(Mittelwerte und Standardabweichungen
von jeweils 4 Fischen / Gruppe)



Versuch "Öle":
je 1 ml Fischöl bzw. Distelöl / kg Fisch
unbehandelte Kontrollgruppe, 6 Tage

Abb. 6 (d-e): Auf mikrosomales Protein bzw. auf die gesamte Leber bezogene Aktivitäten der 7-Ethoxycumarin- und der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase mit Fischöl und Distelöl beimpfter sowie unbehandelter Steinbutts

Eine Erklärungsmöglichkeit für die deutlich niedrigeren Monooxygenase-Aktivitäten dieses Fisches (des ersten der Fischöl-Gruppe) könnte sein, daß es sich um ein unerkannt heranreifendes Weibchen handelte. Die weiblichen Tiere im Versuch "CB 77/2" zeigten ähnlich niedrige Monooxygenase-Aktivitäten, und es ist bekannt, daß weibliche Geschlechtshormone, insbesondere Estradiol, einen hemmenden Einfluß auf diese Monooxygenasen haben (s. 3.3). Andererseits enthielt die Leber dieses Fisches deutlich mehr mikrosomales Protein als alle anderen. Auch die ebenso niedrige ECOD-Aktivität des dritten Fisches dieser Gruppe bei eher durchschnittlicher EROD-Aktivität deutet eher auf andere, unbekanntere Ursachen der Variabilität hin.

Da die injizierte Ölmenge auf das Fischgewicht bezogen wurde, mußte der Leber-Somatische Index zwangsläufig die proportionale Verteilung etwaiger MFO-wirksamer Bestandteile im Fisch und damit die wirksame Dosis in der Leber beeinflussen. Zudem würde, gleichen proportionalen Enzymgehalt der Leber vorausgesetzt, eine größere Leber mit geringerer Protein-bezogener MFO-Aktivität auskommen, um insgesamt die gleiche metabolische Leistung zu erbringen. Deshalb wurden die (auf mikrosomales Protein bezogen ermittelten) MFO-Aktivitäten über den mikrosomalen Proteingehalt und das Gewicht der Leber umgerechnet auf die MFO-Aktivitäten der ganzen Leber (Abb. 6 e): Auf dieser Basis lagen die Aktivitäten beider Monooxygenasen in den mit den Ölen behandelten Tieren deutlich unter denen in den unbehandelten Kontrollen. Besonders ausgeprägt war der Einfluß des Fischöls auf die ECOD-Aktivität.

Leider gibt es über den Einfluß der reinen Pflanzen- bzw. Fischöl-Injektion auf die Monooxygenase-Aktivität in der Fischleber keine Hinweise in der Literatur, da alle Autoren mit reinem Öl behandelte Tiere als Kontrollgruppe verwenden, nicht unbehandelte.

Es ist festzuhalten, daß in derartigen Versuchen möglicherweise die Reaktion des MFO-Systems auf den getesteten Induktor (β -NF, PCB-Kongenere o.ä.) gegenüber natürlichen Umweltbedingungen nicht nur durch den mit Behandlungsstreß verbundenen Applikationsmodus, sondern auch durch eine Reaktion auf das als Träger des Induktors verwendete Öl verfälscht werden kann.

3.2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES VERSUCHS "CB 77/1"

Die Körpermaße der einzelnen Steinbutts aus diesem Versuch sind Tab. 2.2 (Annex 2) zu entnehmen.

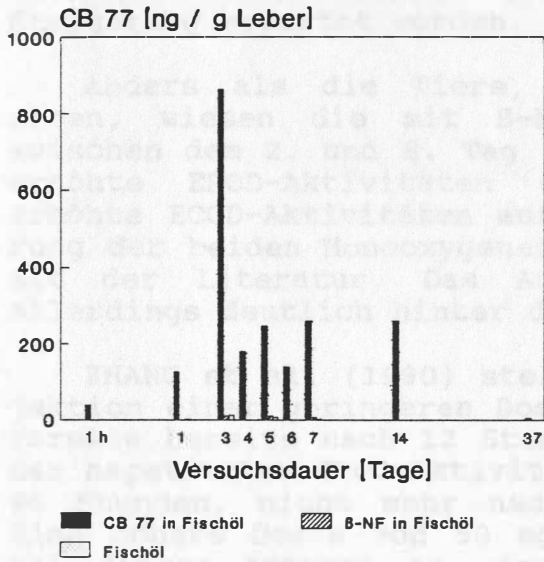
Abb. 7a veranschaulicht die Entwicklung der Gehalte an Chlorbiphenyl Nr. 77 in der Leber der Tiere, und Abb. 7b zeigt (zur besseren Ablesbarkeit der niedrigeren Werte) denselben Sachverhalt in logarithmischer Darstellung. Auch wenn in Rechnung gestellt wird, daß es sich um jeweils nur einen Meßwert handelt, so deutet sich doch an, daß die maximale Konzentration in der Leber der mit diesem PCB beimpften Fische nach 4 - 5 Tagen erreicht war und daß sie dann bis zum 15. Tag relativ konstant blieb. Der extrem hohe Wert am dritten Tag kann als Ausreißer betrachtet werden. Ein Analysenfehler ist auszuschließen, da eine Wiederholung der Analyse dieser Probe das Ergebnis bestätigte. Die Probe wurde vermutlich im Zuge der Präparation oder Aufarbeitung kontaminiert.

Nach der allgemeinen Tendenz des Konzentrationsverlaufes über die Zeit erscheint der vollständige Rückgang der CB-Konzentration am 38. Tag in den Bereich der Grundbelastung (≤ 10 ng/g Leber), der durch die mit Fischöl bzw. β -Naphthoflavon + Fischöl beimpften Tiere repräsentiert wird, zu diesem Zeitpunkt als eher unwahrscheinlich. Unter den mit Chlorbiphenyl beimpften Fischen lagen in dieser Leber die Aktivitäten beider Monooxygenasen geringfügig über dem Bereich der Aktivitäten der nur mit Fischöl behandelten Tiere (Abb. 7c,d), die EROD-Aktivität deutlicher als die ECOD-Aktivität. Dies läßt - bei aller gebotenen Vorsicht gegenüber Einzelwerten - darauf schließen, daß um diese Zeit die Eliminationsrate für das Chlorbiphenyl Nr. 77 erhöht war, und daß der Induktor inzwischen eliminiert worden war.

Während GOOCH et al. (1989a) 5 Tage nach der Injektion von β -NF eine fast zehnfache Steigerung der EROD-Aktivität der Leber von Stenotomus chrysops fanden, war die Steigerung hier deutlich geringer. Im Gegensatz zu deren Ergebnissen, die nach 100 μ g CB 77 / kg Fisch eine etwa doppelt so hohe EROD-Aktivität wie nach 20 mg β -NF aufwiesen, zeigten die Ergebnisse dieses Versuchs (mit Ausnahme der letzten Probe, für die leider keine Kontrolle vorliegt) keine klare Steigerung der EROD-Aktivität durch CB 77 gegenüber der Kontrolle. Das mag einerseits an der geringeren von uns verabreichten Dosis liegen, andererseits könnte die Ursache z.B. in artspezifischen Unterschieden in der Induzierbarkeit der MFO-Systeme liegen. Daneben kommen weitere Faktoren in Betracht, wie die Verfügbarkeit von Bausteinen zur Synthese von MFOs (z.B. Ernährungszustand, Zusammensetzung der Nahrung) oder die Anwesenheit anderer MFO-wirksamer Stoffe.

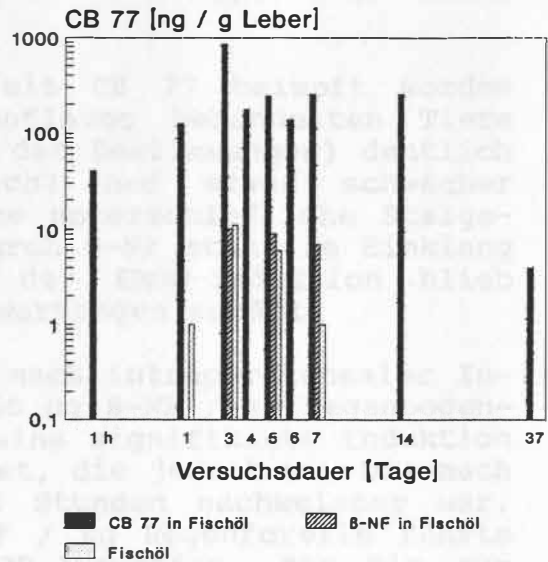
Versuch "CB 77/1" / Ergebnisse 1

a) Chlorbiphenyl Nr 77 - Konzentration in der Leber der Versuchstiere [ng/g Feuchtgewicht] / lineare Skala



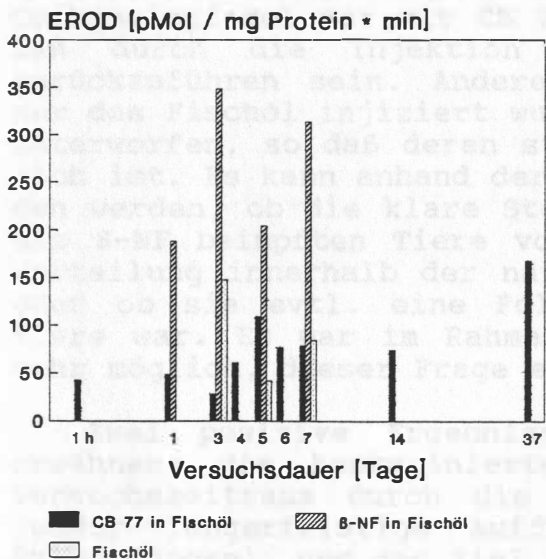
Versuch "CB 77/1": CB-Konzentrationen / 0,05 mg CB 77 bzw. 20 mg B-NF und 1 ml Fischöl / kg Fisch (einmal. Inj.)

b) Chlorbiphenyl Nr 77 - Konzentration in der Leber der Versuchstiere [ng/g Feuchtgewicht] / logar. Skala



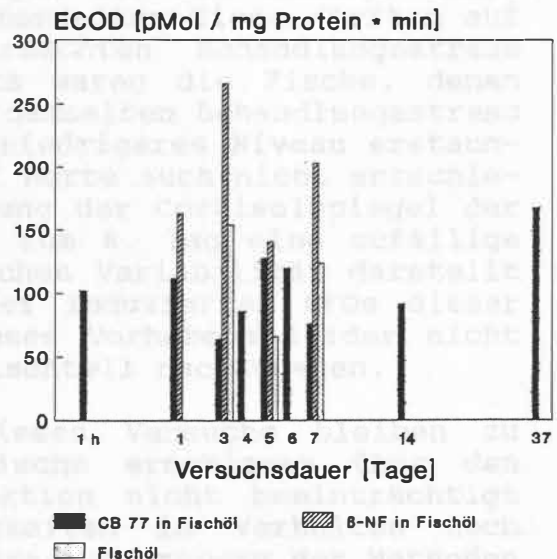
Versuch "CB 77/1": CB-Konzentrationen / 0,05 mg CB 77 bzw. 20 mg B-NF und 1 ml Fischöl / kg Fisch (einmal. Inj.)

c) EROD-Aktivität in der Leber der Tiere in Abhängigkeit von Versuchsdauer und intraperitoneal injizierter Substanz



Versuch "CB 77/1": EROD - Aktivität, 0,05 mg CB 77 bzw. 20 mg B-NF bzw. 1 ml Fischöl / kg Fisch

d) ECOD-Aktivität in der Leber der Tiere in Abhängigkeit von Versuchsdauer und intraperitoneal injizierter Substanz



Versuch "CB 77/1": ECOD - Aktivität, 0,05 mg CB 77 bzw. 20 mg B-NF bzw. 1 ml Fischöl / kg Fisch

Abb. 7a-d: Entwicklung der Chlorbiphenyl-77-Konzentration, der EROD- bzw. ECOD-Aktivität in der Steinbuttleber über die Zeit im Versuch "CB 77/1"

Für die ECOD-Aktivität war durch CB 77, das ja nach der Literatur ein Induktor des reinen 3-MC-Typs ist, keine Steigerung erwartet worden.

Anders als die Tiere, die mit CB 77 beimpft worden waren, wiesen die mit β -Naphthoflavin behandelten Tiere zwischen dem 2. und 8. Tag (Ende der Bestimmungen) deutlich erhöhte EROD-Aktivitäten (3-4fach) und etwas schwächer erhöhte ECOD-Aktivitäten auf. Eine unterschiedliche Steigerung der beiden Monooxygenasen durch β -NF steht im Einklang mit der Literatur. Das Ausmaß der EROD-Induktion blieb allerdings deutlich hinter den Erwartungen zurück.

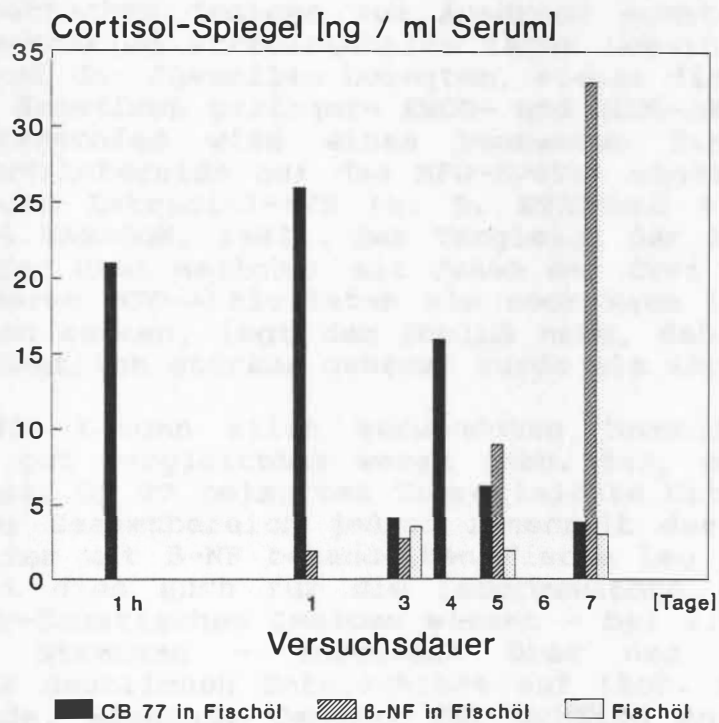
ZHANG et al. (1990) stellten nach intraperitonealer Injektion einer geringeren Dosis ($50 \mu\text{g } \beta\text{-NF} / \text{kg}$ Regenbogenforelle bereits nach 12 Stunden eine signifikante Induktion der hepatischen EROD-Aktivität fest, die jedoch nur bis nach 96 Stunden, nicht mehr nach 192 Stunden nachweisbar war. Eine höhere Dosis von $50 \text{ mg } \beta\text{-NF} / \text{kg}$ Regenforelle führte bei diesen Autoren zu einer EROD-Induktion, die bis zum Versuchsende nach 59 Tagen andauerte. Die ECOD-Aktivität der Fischleber wurde auch bei ZHANG et al. schwächer induziert als die EROD-Aktivität: nach einmaliger Dosis von $50 \mu\text{g} / \text{kg}$ Fisch war die Induktion nur nach 48 h, aber weder nach 24 noch nach 96 h nachzuweisen.

Die wenigen Daten über den Cortisolspiegel im Blutserum lassen nur einige vage Anmerkungen zu: Die anfangs hohen Cortisolspiegel der mit CB 77 behandelten Tiere dürften auf den durch die Injektion verursachten Behandlungsstress zurückzuführen sein. Andererseits waren die Fische, denen nur das Fischöl injiziert wurde, demselben Behandlungsstress unterworfen, so daß deren stets niedrigeres Niveau erstaunlich ist. Es kann anhand der drei Werte auch nicht entschieden werden, ob die klare Steigerung der Cortisolspiegel der mit β -NF beimpften Tiere vom 4. zum 8. Tag eine zufällige Verteilung innerhalb der natürlichen Variabilität darstellt oder ob sie evtl. eine Folge der induzierten MFOs dieser Tiere war. Es war im Rahmen dieses Vorhabens leider nicht mehr möglich, dieser Frage experimentell nachzugehen.

Zwei positive Ergebnisse dieses Versuchs bleiben zu erwähnen; die kontaminierten Fische erschienen über den Versuchszeitraum durch die Injektion nicht beeinträchtigt (weder längerfristige Auffälligkeiten im Verhalten noch Entzündungen), und das Ziel der Praxiserprobung der Methoden konnte erfolgreich abgeschlossen werden.

Versuch "CB 77/1" / Ergebnisse 2

e) Cortisol - Spiegel im Blutserum
der Versuchstiere [ng / ml]
nach Behandlung und Versuchsdauer



Versuch "CB 77/1": Cortisol-Spiegel
0,05 mg CB 77 bzw. 20 mg β-NF und
1 ml Fischöl / kg Fisch (einmal. Inj.)

Abb. 7 e: Cortisolgehalte im Blutserum der Fische im Versuch "CB 77/1" nach Behandlung und Versuchsdauer

3.3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES VERSUCHS "CB 77/2"

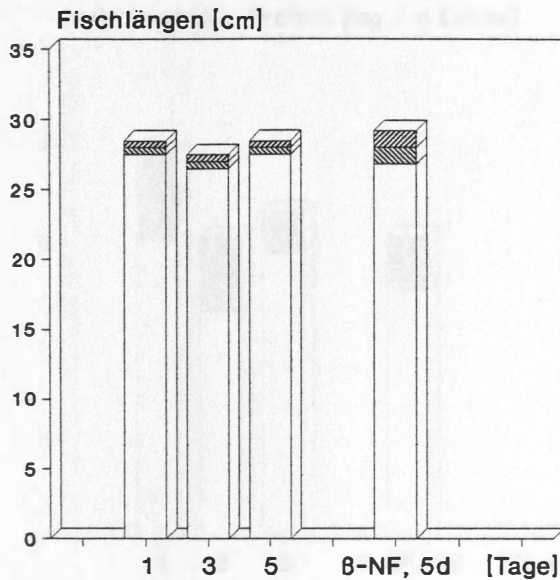
Die Ergebnisse dieses Versuchs sind zusammen mit den Körpermaßen der verwendeten Steinbutts in Tab. 2.3 (Annex 2) aufgelistet. Die drei bei der Präparation der Lebern als Weibchen erkannten Fische sind darin gesondert aufgeführt, weil sie sich in einigen Parametern sehr deutlich von den juvenilen Fische unterschieden: Bei vergleichbaren Längen und Gewichten hatten die Lebern der weiblichen Tiere übereinstimmend annähernd das doppelte Gewicht, wie auch in den Leber-Somatischen Indices zum Ausdruck kommt. Während sich die mikrosomalen Proteingehalte ihrer Lebern durchaus im Bereich derer der Juvenilen bewegten, wiesen die Weibchen vom 1. Tag an drastisch geringere EROD- und ECOD-Aktivitäten auf. Der Unterschied wird einem hemmenden Einfluß der weiblichen Sexualsteroiden auf das MFO-System zugeschrieben, insbesondere des Estradiol-17 β (z. B. STEGEMAN & CHEVION, 1980; FÖRLIN & HANSSON, 1982). Der Vergleich der ECOD/EROD-Verhältnisse der drei Weibchen mit denen der drei Juvenilen nach 1 Tag, deren MFO-Aktivitäten als noch kaum induzierte Referenz dienen können, legt den Schluß nahe, daß die EROD der Weibchen deutlich stärker gehemmt wurde als ihre ECOD.

Während die Längen aller verwendeten juvenilen Tiere untereinander gut vergleichbar waren (Abb. 8a), wiesen die Gewichte der mit CB 77 beimpften Tiere leichte Unterschiede auf, wobei der Gesamtbereich jedoch innerhalb des Bereichs der Gewichte der mit β -NF behandelten Fische lag (Abb. 8b). Annähernd gilt dies auch für die Lebergewichte (Abb. 8c). Auch die Leber-Somatischen Indices wiesen - bei z.T. großer individueller Streuung insgesamt über den Versuchszeitraum keine deutlichen Unterschiede auf (Abb. 8d). Eine sich andeutende, sinkende Tendenz der Gehalte an mikrosomalem Protein (Abb. 8e) wird durch besonders niedrige Werte nach 3 Tagen relativiert; mit einsetzender MFO-Induktion wäre auch eher ein Anstieg des mikrosomalen Proteingehalts zu erwarten (z.B. ADDISON et al., 1978).

Während die 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität der juvenilen Fische sowohl durch 3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl als auch durch β -Naphthoflavin bis zum 5. Tag nach der Injektion eindeutig induziert wurde (Abb. 8 g,i,k), war eine Induktion der 7-Ethoxycumarin-O-deethylase nur durch β -NF eindeutig nachweisbar (Abb. 8 h,j,l). Zwar scheint sich auch bei den mit CB 77 behandelten Steinbutts tendenziell eine leichte ECOD-Induktion anzudeuten; diese ist aber nicht überzeugend und stünde überdies im Widerspruch zur Literatur, nach der CB 77 ein Induktor des reinen 3-MC-Typs ist.

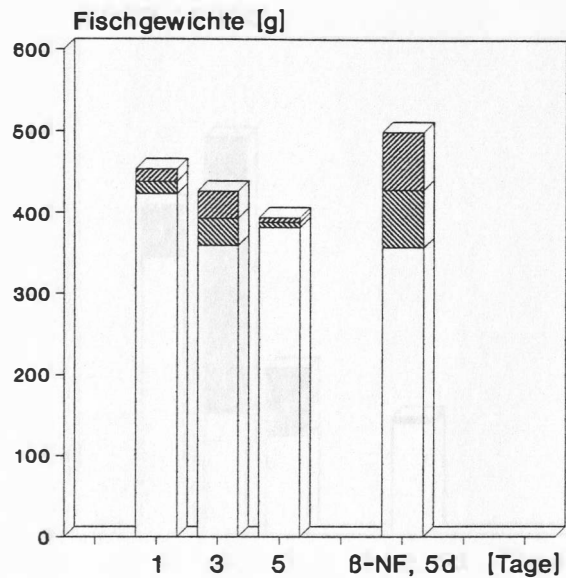
Versuch "CB 77/2": Morphometrische Merkmale

a) Länge der Fische
(Mittelwerte und Standardabweichungen
von jeweils 3 juvenilen Fischen)



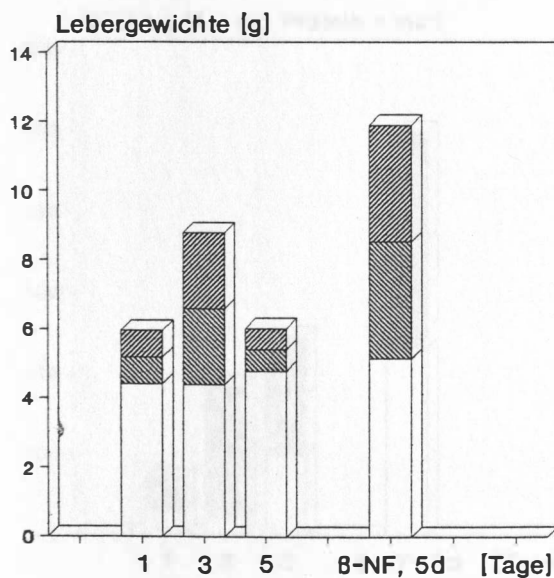
Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg 8-NF / kg Fisch

b) Gewicht der Fische
(Mittelwerte und Standardabweichungen
von jeweils 3 juvenilen Fischen)



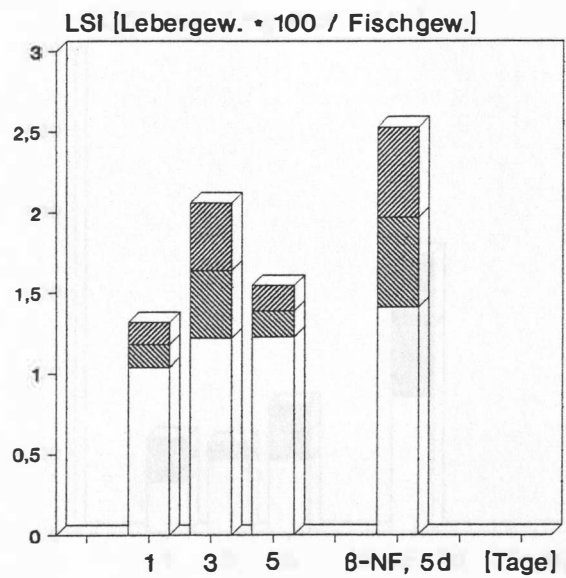
Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg 8-NF / kg Fisch

c) Lebergewicht der Fische
(Mittelwerte und Standardabweichungen
von jeweils 3 juvenilen Fischen)



Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg 8-NF / kg Fisch

d) Leber-Somatischer Index
(Mittelwerte und Standardabweichungen
von jeweils 3 juvenilen Fischen)

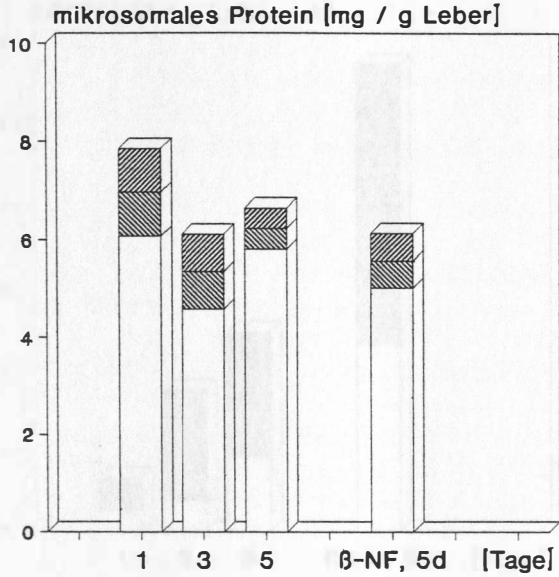


Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg 8-NF / kg Fisch

Abb. 8a-d): Längen, Fischgewichte, Lebergewichte bzw. Leber-Somatische Indices der Steinbutts im Versuch "CB 77/2"

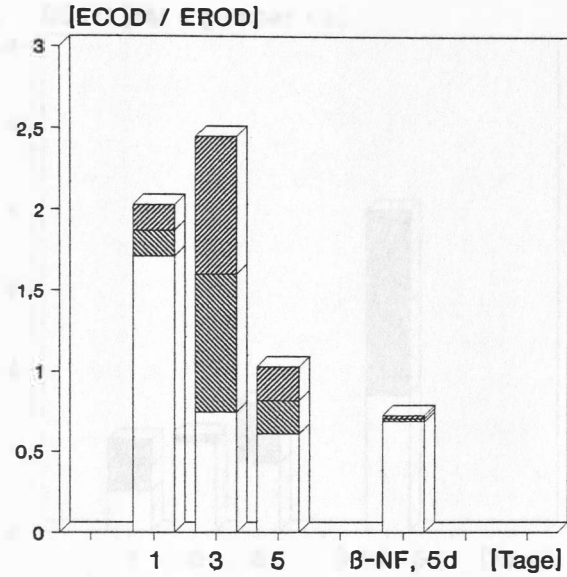
Versuch "CB 77/2": Effekte in der Leber / 1

e) Gehalt an mikrosomalem Protein
(Mittelwerte und Standardabweichungen
aus den Lebern von je 3 Juvenilen)



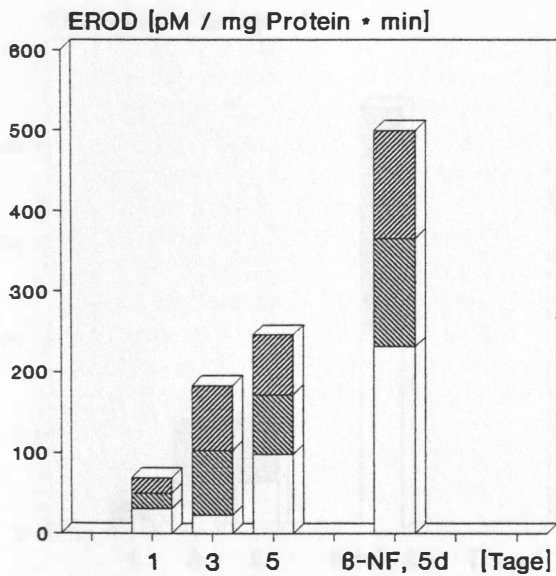
Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg β-NF / kg Fisch

f) ECOD/EROD-Verhältnis
(Mittelwerte und Standardabweichungen
aus den Lebern von je 3 Juvenilen)



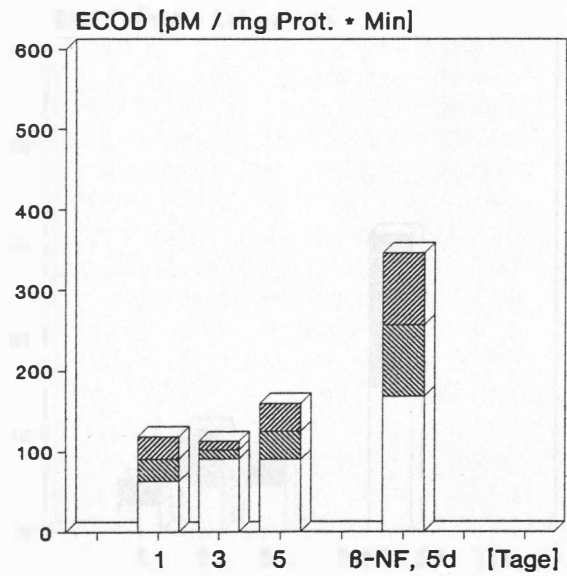
Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg β-NF / kg Fisch

g) EROD-Aktivität / mikros. Prot.
(Mittelwerte und Standardabweichungen
aus den Lebern von je 3 Juvenilen)



Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg β-NF / kg Fisch

h) ECOD-Aktivität / mikros. Prot.
(Mittelwerte und Standardabweichungen
aus den Lebern von je 3 Juvenilen)

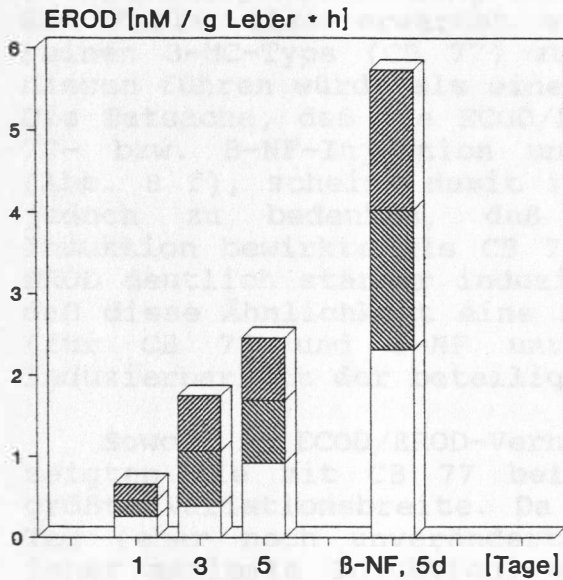


Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg β-NF / kg Fisch

Abb. 8e-h): Mikrosomale Proteingehalte, ECOD/EROD-Verhältnisse und auf mikrosomales Protein bezogene EROD- bzw. ECOD-Aktivitäten in den Lebern der juvenilen Steinbutts im Versuch "CB 77/2"

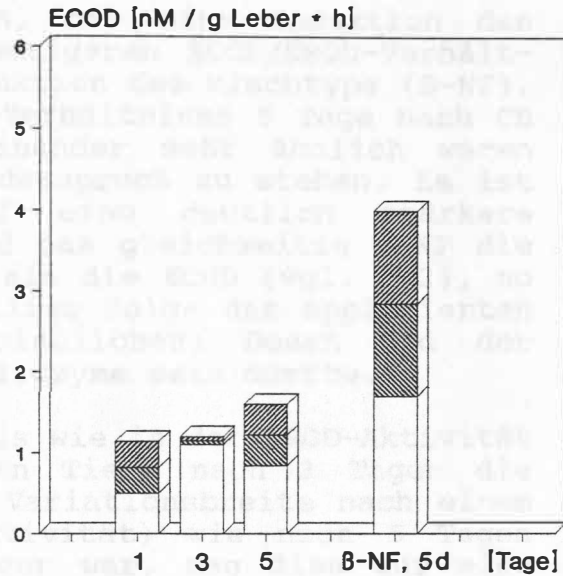
Versuch "CB 77/2": Effekte in der Leber / 2

i) EROD-Aktivität / g Leber
(Mittelwerte und Standardabweichungen
aus den Lebern von je 3 Juvenilen)



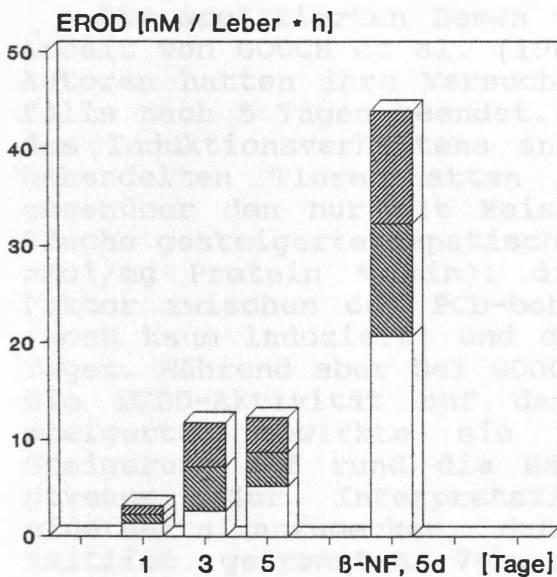
Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg β-NF / kg Fisch

j) ECOD-Aktivität / g Leber
(Mittelwerte und Standardabweichungen
aus den Lebern von je 3 Juvenilen)



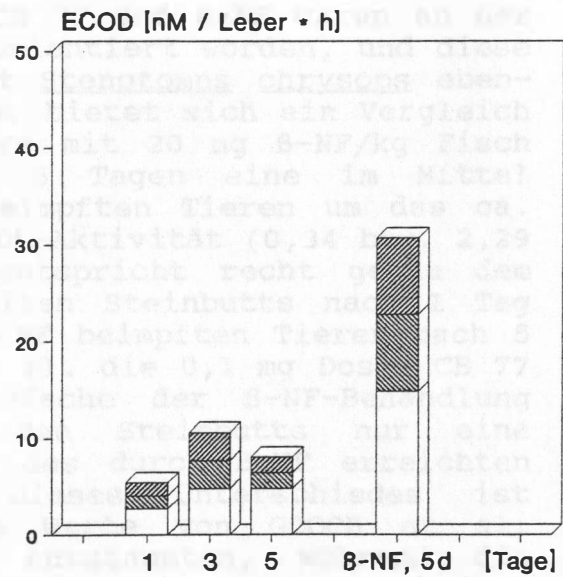
Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg β-NF / kg Fisch

k) EROD-Aktivität / ganze Leber
(Mittelwerte und Standardabweichungen
aus den Lebern von je 3 Juvenilen)



Versuch "CB 77":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg β-NF / kg Fisch

l) ECOD-Aktivität / ganze Leber
(Mittelwerte und Standardabweichungen
aus den Lebern von je 3 Juvenilen)



Versuch "CB 77/2":
0,1 mg CB 77 bzw. 20 mg β-NF / kg Fisch

Abb. 8 i-l: Auf 1 g Leber bzw. die ganze Leber bezogene EROD- bzw. ECOD-Aktivitäten in den Lebern der juvenilen Steinbutts im Versuch "CB 77/2"

Eine EROD-Induktion muß bei unveränderter ECOD-Aktivität zwangsläufig zur Senkung des ECOD/EROD-Verhältnisses führen. Es könnte also erwartet werden, daß eine Induktion des reinen 3-MC-Typs (CB 77) zu niedrigeren ECOD/EROD-Verhältnissen führen würde als eine Induktion des Mischtyps (β -NF). Die Tatsache, daß die ECOD/EROD-Verhältnisse 5 Tage nach CB 77- bzw. β -NF-Injektion untereinander sehr ähnlich waren (Abb. 8 f), scheint damit im Widerspruch zu stehen. Es ist jedoch zu bedenken, daß β -NF eine deutlich stärkere Induktion bewirkte als CB 77 und daß gleichzeitig β -NF die EROD deutlich stärker induziert als die ECOD (vgl. 3.2), so daß diese Ähnlichkeit eine zufällige Folge der applizierten (für CB 77 und β -NF unterschiedlichen) Dosen und der Induzierbarkeit der beteiligten Isozyme sein dürfte.

Sowohl im ECOD/EROD-Verhältnis wie in der EROD-Aktivität zeigten die mit CB 77 beimpften Tiere nach 3 Tagen die größte Variationsbreite. Da die Variationsbreite nach einem Tag (eher noch unveränderte Aktivität) wie nach 5 Tagen (eher maximale Induktion) geringer war, mag dies auf eine individuell verschiedene Geschwindigkeit des Übergangs (Raten der Aufnahme des Induktors in die Leber, der Bindung an den Ah-Rezeptor, Transskription, Enzymsynthese usw.) hinweisen; andererseits wies diese Fischgruppe auch die größte Variationsbreite im Leber-Somatischen Index auf, so daß in den Lebern dieser Tiere auch die effektiven Chlorbiphenyl-Konzentrationen am ungleichmäßigsten gewesen sein dürften.

Die applizierten Dosen von CB 77 und β -NF waren an der Arbeit von GOOCH et al. (1989) orientiert worden, und diese Autoren hatten ihre Versuche mit Stenotomus chrysops ebenfalls nach 5 Tagen beendet. Daher bietet sich ein Vergleich des Induktionsverhaltens an: Ihre mit 20 mg β -NF/kg Fisch behandelten Tiere hatten nach 5 Tagen eine im Mittel gegenüber den nur mit Maisöl beimpften Tieren um das ca. 7fache gesteigerte hepatische EROD-Aktivität (0,34 bzw. 2,29 nMol/mg Protein * min); dies entspricht recht genau dem Faktor zwischen den PCB-behandelten Steinbutts nach 1 Tag (noch kaum induziert) und den β -NF beimpften Tieren nach 5 Tagen. Während aber bei GOOCH et al. die 0,1 mg Dosis CB 77 die EROD-Aktivität auf das 2-3fache der β -NF-Behandlung steigerte, bewirkte sie bei den Steinbutts nur eine Steigerung auf rund die Hälfte des durch β -NF erreichten Niveaus. Zur Interpretation dieses Unterschiedes ist einerseits anzumerken, daß die Werte von GOOCH et al. zeitlich getrennten Versuchen entstammten, während die Steinbutts parallel in einer Versuchsserie bearbeitet wurden. Andererseits könnte der Unterschied auf art- und induktorspezifische Unterschiede in der Reaktion der MFO-Systeme hinweisen, und es muß auf den schlechten Ernährungszustand der Steinbutts hingewiesen werden.

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DES VERSUCHS "3 CBs"

Einen Überblick über die arithmetrischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Körpermaße und MFO-Aktivitäten der nach Behandlung und Versuchsdauer sortierten Gruppen von Versuchstieren bietet Tab. 2.4 (Annex 2).

Die Längen und Gewichte (Abb. 9 a,a' bzw. b,b') aller Versuchstiergruppen waren untereinander gut vergleichbar. Dagegen unterschieden sich die Lebergewichte und folglich auch die Leber-Somatischen Indices (Abb. 9 c,c' bzw. d,d') der nur mit dem Fischöl beimpften Tiere zwischen den beiden Probenahmen deutlich, indem sie nach 1 Tag besonders tief, nach 7 Tagen besonders hoch waren. Es ist unwahrscheinlich, daß dieser Unterschied eine Folge der Behandlung ist, weil er dann unter den mit Fischöl + Chlorbiphenyl bzw. β -NF beimpften Fischen ebenfalls hätte auftreten müssen. Es ist daher anzunehmen, daß es sich um einen zufälligen Unterschied handelt, der der zu geringen Stückzahl (je 4) zuzuschreiben ist.

Dies gilt auch für Unterschiede in den mikrosomalen Proteingehalten der Lebern (Abb. 9 e,e'), die z.B. zwischen den beiden Probenahmen der mit Fischöl beimpften Tiere auftraten: beide Wertebereiche lagen innerhalb der Bereiche, die für die mikrosomalen Proteingehalte der unbehandelten Kontrollen wie auch der mit β -NF beimpften Fische, die überdies untereinander fast deckungsgleich waren, ermittelt wurden.

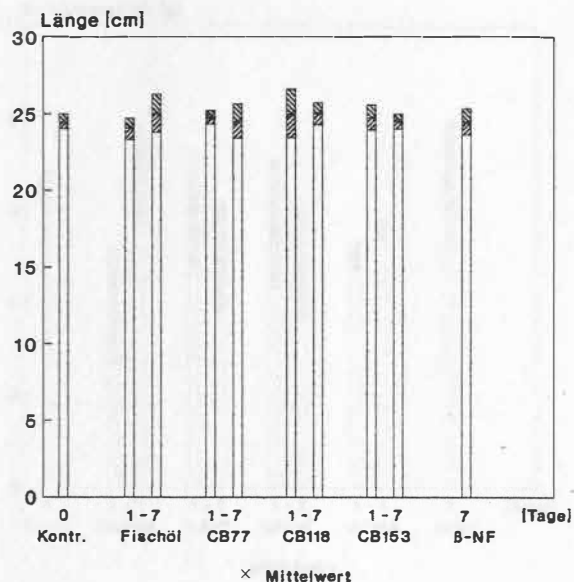
In Abb. 9 g,g' und 9 i,i' sind die auf mikrosomales Protein bzw. auf die gesamte Leber bezogenen EROD-Aktivitäten dargestellt. Die 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase der Lebern wurde, wie im vorangegangenen Versuch, durch β -NF eindeutig induziert und durch das reine Fischöl leicht abgesenkt. Während der Faktor zwischen den EROD-Aktivitäten nach der Fischöl- bzw. β -NF-Beimpfung im Mittel ca. 7 war, betrug er in diesem Versuch nur ca. 2,5. Als Ursachen für diese geringere Steigerung kommen z.B. die Umstände in Frage, daß die Versuchsdauer dort 5 Tage, hier 7 Tage betrug, und daß die Ausgangsaktivität in diesem Versuch aus unbekanntem Gründen etwa 3mal so hoch war wie im vorangegangenen.

Für die höhere Ausgangsaktivität mag es eine Rolle spielen, daß diese Tiere erst 2 Wochen vor Versuchsbeginn aus Bülk geholt worden waren (Transportstreß, besserer Ernährungszustand, Reste einer Induktion in Bülk durch andere Substanzen als Chlorkohlenwasserstoffe o. ä.). Die Temperatur- und Salinitätsunterschiede zwischen den beiden Versuchen waren relativ geringfügig (s. 2.4.3. bzw. 3.4.4.), so daß sie als Ursache ausscheiden.

Versuch "3 CBs" / Morphometrische Merkmale 1

a) Länge der Fische

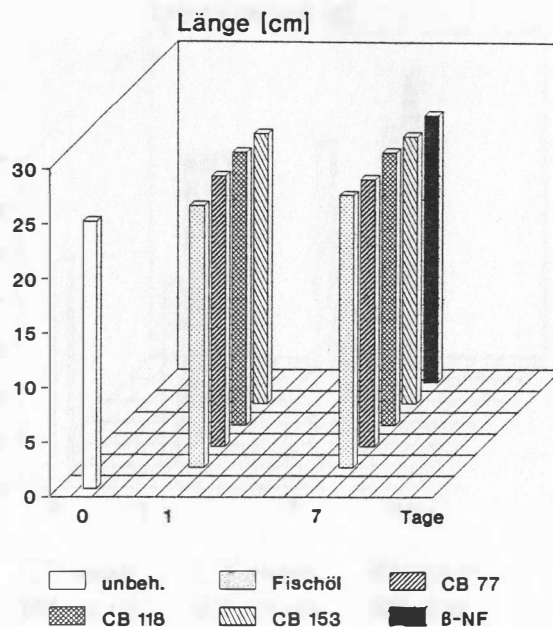
Versuch "3 CBs": 1 ml Fischöl und 0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch



(Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

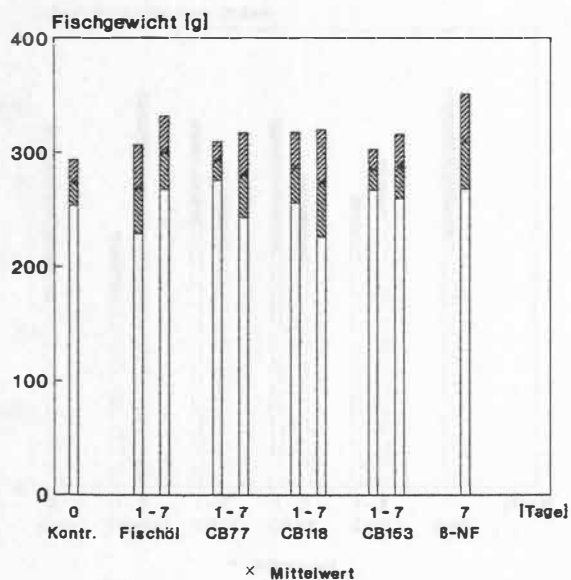
a') Länge der Fische

geometrische Mittel



b) Gewicht der Fische

Versuch "3 CBs": 1 ml Fischöl und 0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch



(Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

b') Gewicht der Fische

geometrische Mittel

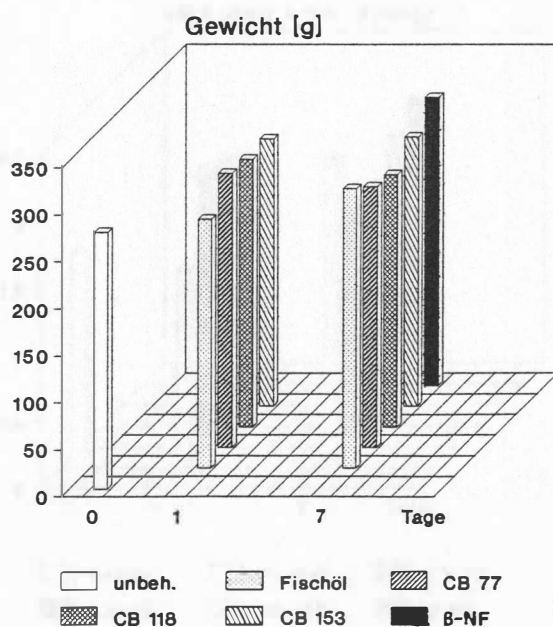
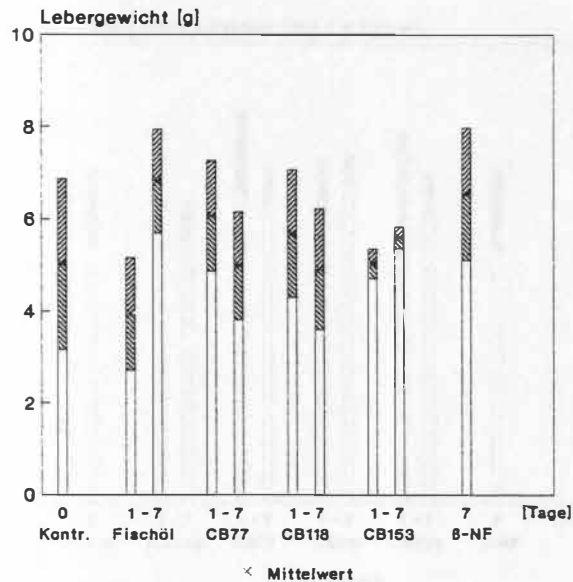


Abb. 9 (a, a', b, b'): Arithmetrische Mittel (\pm Standardabw.) bzw. geometrische Mittel der Längen bzw. Gewichte der Steinbutts im Versuch "3 CBs"

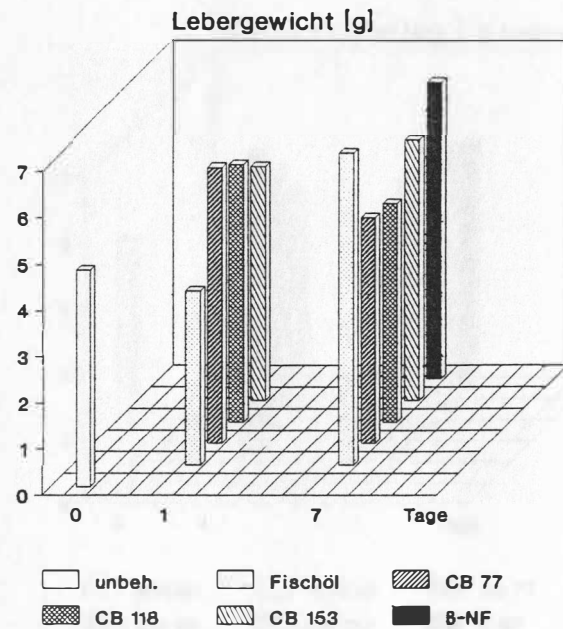
Versuch "3 CBs" / Morphometrische Merkmale 2

c) Lebergewicht der Fische
 Versuch "3 CBs": 1 ml Fischöl und
 0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch

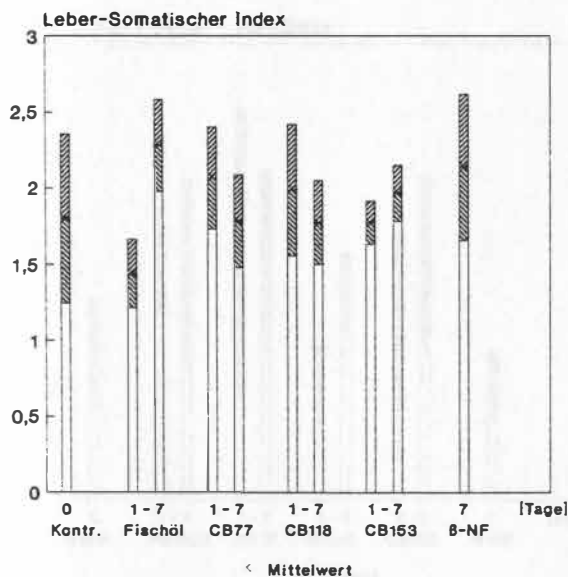


(Mittelwerte und Standardabweichungen
 aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

c') Lebergewicht der Fische
 geometrische Mittel



d) Leber-Somatischer Index (LSI)
 Versuch "3 CBs": 1 ml Fischöl und
 0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch



(Mittelwerte und Standardabweichungen
 aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

d') Leber-Somatischer Index
 geometrische Mittel

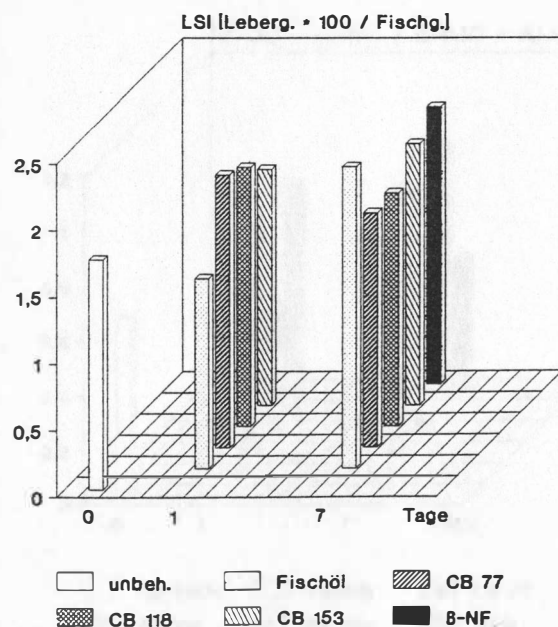
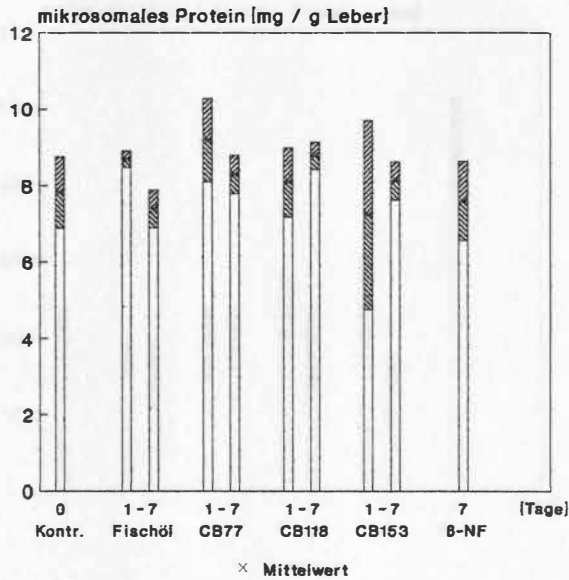


Abb. 9 (c,c'.d,d'): Arithmetrische Mittel (\pm Standardabw.) bzw. geometrische Mittel der Lebergewichte bzw. Leber-Somatischen Indices der Steinbutts im Versuch "3 CBs"

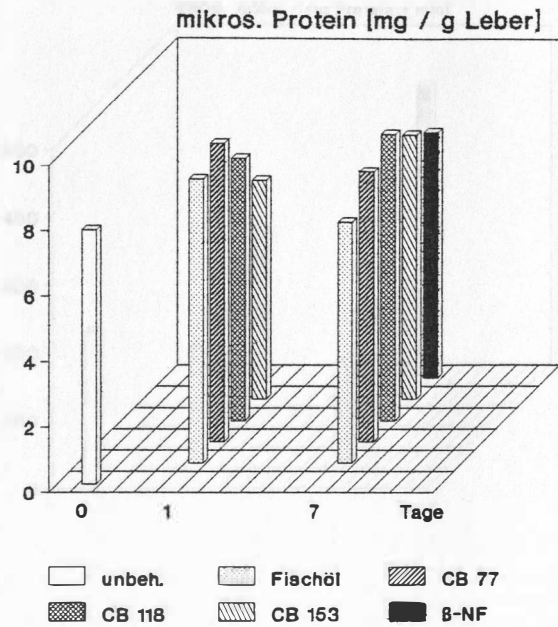
Versuch "3 CBs" / Effekte in der Leber - 1

e) Mikrosomales Protein der Leber
 Versuch "3 CBs": 1 ml Fischöl und
 0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch

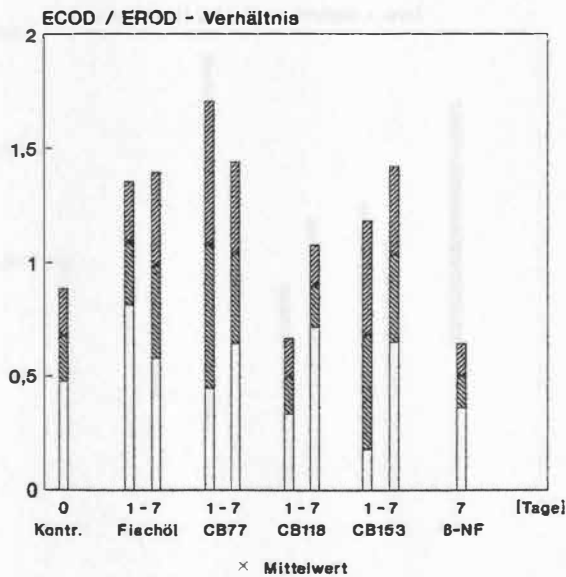


(Mittelwerte und Standardabweichungen
 aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

e') Mikrosomales Protein
 geometrisches Mittel



f) ECOD / EROD - Verhältnis
 Versuch "3 CBs": 1 ml Fischöl und
 0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch



(Mittelwerte und Standardabweichungen
 aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

f') ECOD / EROD - Verhältnis
 geometrisches Mittel

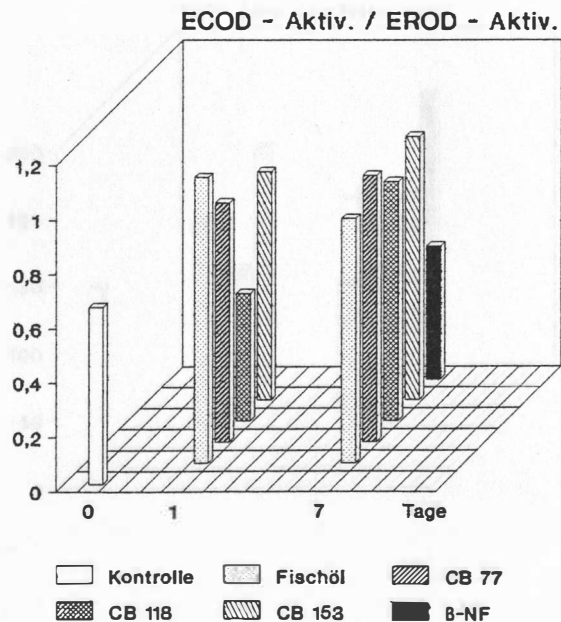
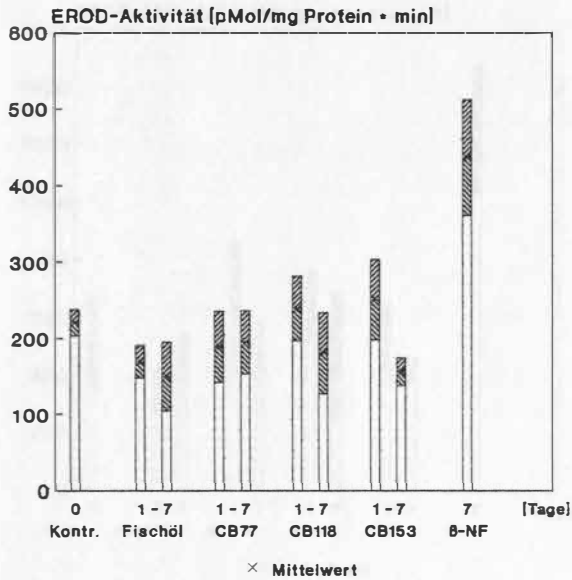


Abb. 9 (e,e'.f,f'): Arithmetrische Mittel (\pm Standardabw.) bzw. geometrische Mittel der mikrosomalen Proteingehalte bzw. der ECOD/EROD-Verhältnisse der Steinbuttlebern im Versuch "3 CBs"

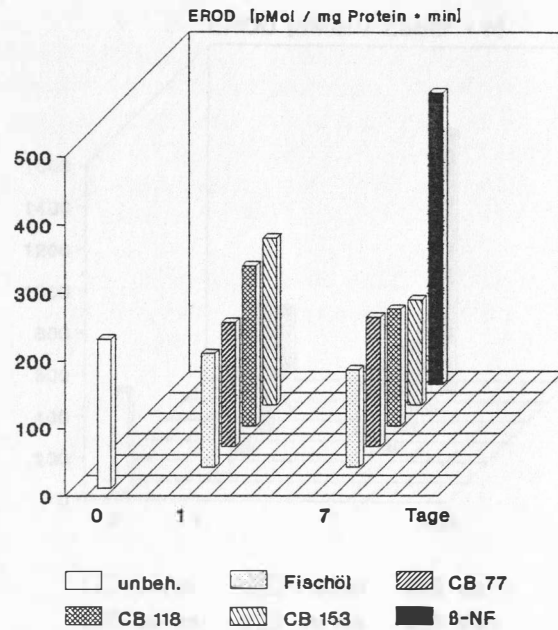
Versuch "3 CBs" / Effekte in der Leber - 2

g) EROD - Aktivität / Protein
Versuch "3 CBs", 1 ml Fischöl und
0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch

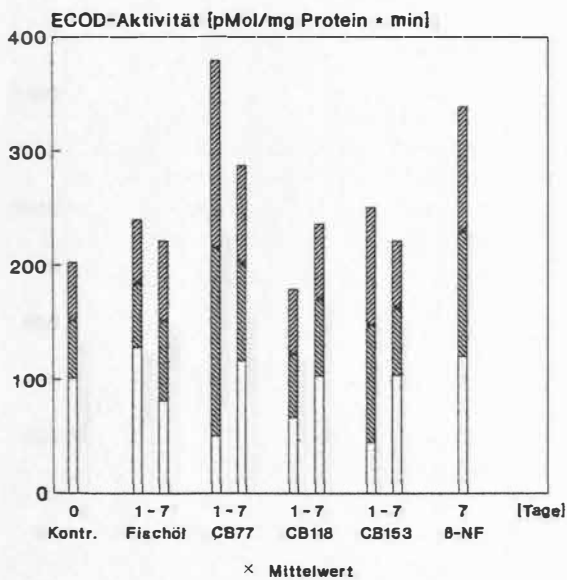


(Mittelwerte und Standardabweichungen
aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

g') EROD - Aktivität / Protein
geometrisches Mittel



h) ECOD - Aktivität / Protein
Versuch "3 CBs": 1 ml Fischöl und
0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch



(Mittelwerte und Standardabweichung
aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

h') ECOD - Aktivität / Protein
geometrisches Mittel

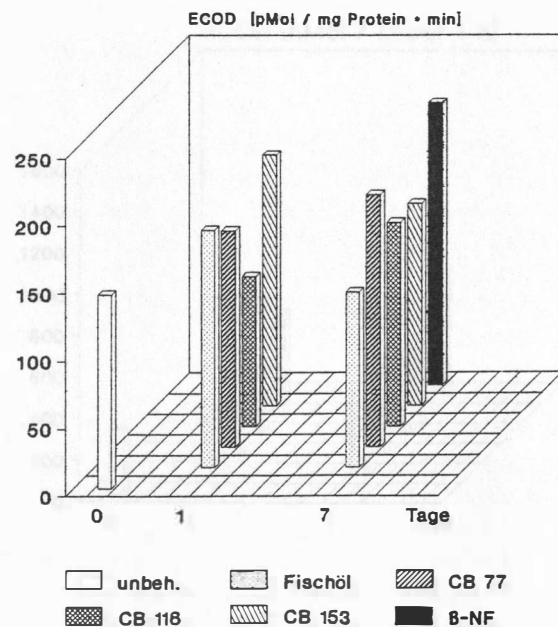
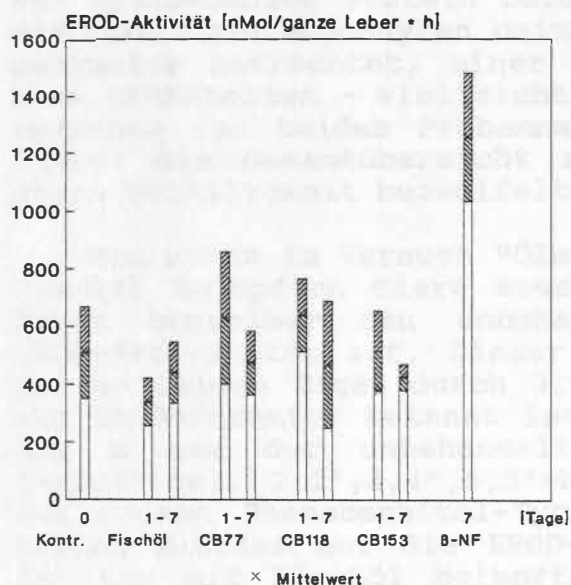


Abb. 9 (g,g',h,h'): Arithmetrische Mittel (\pm Standardabw.) bzw. geometrische Mittel der auf mikrosomales Protein bezogenen Aktivität der 7-Ethoxycumarin- bzw. 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase der Steinbuttlebern im Versuch "3 CBs"

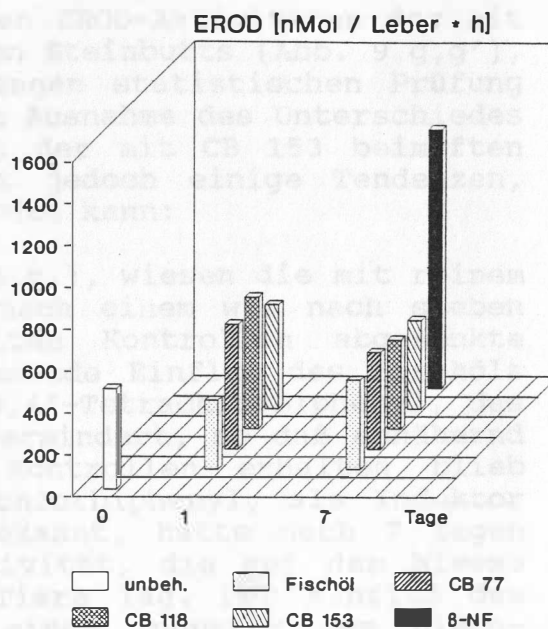
Versuch "3 CBs" / Effekte in der Leber - 3

i) EROD - Aktivität / Leber
 Versuch "3 CBs": 1 ml Fischöl und
 0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch

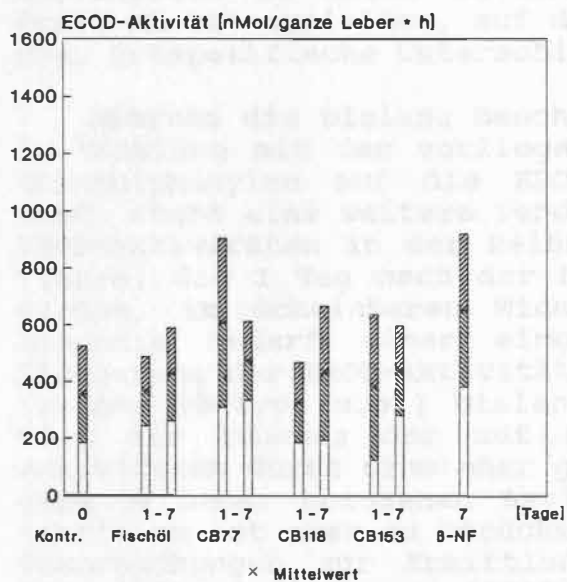


(Mittelwerte und Standardabweichungen
 aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

i') EROD - Aktivität / Leber
 geometrisches Mittel



j) ECOD - Aktivität / Leber
 Versuch "3 CBs": 1 ml Fischöl und
 0,1 mg CB bzw. 20 mg β -NF / kg Fisch



(Mittelwerte und Standardabweichungen
 aus jeweils 4 juvenilen Steinbutts)

j') ECOD - Aktivität / Leber
 geometrisches Mittel

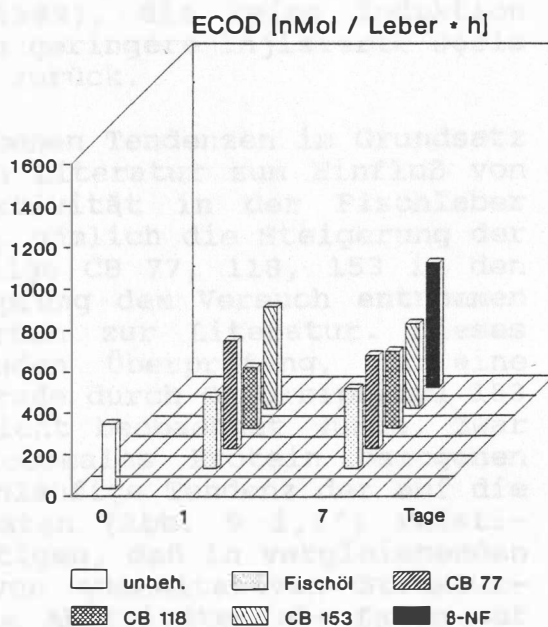


Abb. 9 (i,i'.j,j'): Arithmetrische Mittel (\pm Standardabw.) bzw. geometrische Mittel der auf die ganze Leber bezogenen Aktivität der 7-Ethoxycumarin- bzw. 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase in den Steinbutts im Versuch "3 CBs"

Zwar dürften sich andeutende Unterschiede zwischen den auf mikrosomales Protein bezogenen EROD-Aktivitäten der mit den drei Chlorbiphenylen beimpften Steinbutts (Abb. 9 g,g'), paarweise betrachtet, einer strengen statistischen Prüfung kaum standhalten - vielleicht mit Ausnahme des Unterschiedes zwischen den beiden Probennahmen der mit CB 153 beimpften Tiere; die Gesamtübersicht zeigt jedoch einige Tendenzen, deren Zufälligkeit bezweifelt werden kann:

Wie schon im Versuch "Öle" (s.o.), wiesen die mit reinem Fischöl beimpften Tiere sowohl nach einem wie nach sieben Tagen gegenüber den unbehandelten Kontrollen abgesenkte EROD-Aktivitäten auf. Dieser hemmende Einfluß des Fischöls war an beiden Tagen durch 3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl, das als EROD-Induktor bekannt ist, vermindert, so daß annähernd das Niveau der unbehandelten Kontrollen erhalten blieb (Induktion). 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl, als Induktor des reinen Phenobarbital-Typs bekannt, hatte nach 7 Tagen keinen Einfluß auf die EROD-Aktivität, die auf dem Niveau der nur mit Fischöl beimpften Tiere lag. Der Einfluß des 2,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl, einem Induktor des Misch-Typs, lag nach 7 Tagen im Mittel zwischen denen der beiden erstgenannten PCBs, so daß eine Induktion (wenn auch schwächer als durch CB 77) angenommen werden kann. Eine EROD-induzierende Wirkung von CB 118 stellten auch SKAARE et al. (1991) in der Regenbogenforellenleber fest. Sie injizierten eine Dosis von 30 mg/kg Fischgewicht und führen den Widerspruch zu GOOCH et al. (1989), die keine Induktion durch CB 118 erzielten, auf deren geringere injizierte Dosis oder artspezifische Unterschiede zurück.

Während die bislang beschriebenen Tendenzen im Grundsatz im Einklang mit der vorliegenden Literatur zum Einfluß von Chlorbiphenylen auf die EROD-Aktivität in der Fischleber sind, steht eine weitere Tendenz, nämlich die Steigerung der EROD-Aktivitäten in der Reihenfolge CB 77, 118, 153 in den Tieren, die 1 Tag nach der Beimpfung dem Versuch entnommen wurden, im scheinbaren Widerspruch zur Literatur. Dieses Ergebnis bedarf einer eingehenden Überprüfung, da eine Steigerung der EROD-Aktivität gerade durch Chlorbiphenyl 153 (reiner PB-Typ, s.o.) bislang nicht beobachtet wurde. Zwar wird die Tendenz der auf mikrosomales Protein bezogenen Aktivitäten durch eine eher gegenläufige Tendenz der auf die gesamte Leber bezogenen Aktivitäten (Abb. 9 i,i') relativiert; es ist aber zu berücksichtigen, daß in vergleichenden Untersuchungen zur Ermittlung von quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) die Aktivitäten ebenfalls auf mikrosomales Protein bezogen wurden, und daß dabei überwiegend mit höheren Chlorbiphenyl-Dosen (um maximale Induktion zu erreichen) und längeren Versuchsdauern (zwischen 3 und 7 Tagen) gearbeitet wurde.

Die ECOD-Aktivitäten (Abb. 9 h,h',j,j') lassen, bedingt durch die sehr großen Streuungen, keine Tendenzen erkennen. Selbst das β -NF rief in diesem Versuch keine deutlich erkennbare ECOD-Induktion hervor. Dies läßt in Verbindung mit der relativ hohen Variabilität innerhalb der Gruppen darauf schließen, daß die Fische noch nicht lange genug in den Versuchsbecken gelebt hatten, so daß sie noch aus Bülk oder vom Transport her Einflüssen ausgesetzt waren, die stärkeren Einfluß auf die ECOD-Aktivität hatten als die applizierten Induktoren. Auch die ECOD/EROD-Verhältnisse (Abb. 9 f,f') zeigen keine klare Tendenz, mit Ausnahme des Verhältnisses in den Lebern der mit β -NF beimpften Tiere, das erwartungsgemäß besonders niedrig war: β -Naphthoflavin induziert bekanntlich die EROD stärker als die ECOD. Dagegen gibt es keine plausible Erklärung für das genauso niedrige mittlere ECOD/EROD-Verhältnis in den Lebern der mit CB 118 beimpften Tiere nach einem Tag; es muß als weiteres Beispiel dafür gewertet werden, daß der Zufall wegen der zu geringen Anzahl von Versuchstieren eine zu erhebliche Rolle spielte.

4. ZUSAMMENFASSENDEN DISKUSSION UND FOLGERUNGEN

Die Ergebnisse der im Projekt durchgeführten Versuche bestätigen zwar im wesentlichen aus der Literatur bekannte Sachverhalte, einzelne Befunde machen jedoch im Zusammenhang mit widersprüchlichen Angaben in der Literatur eine kritische Auseinandersetzung mit gängigen Vorstellungen nötig.

Die Basisaktivität der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase in der Steinbuttleber dürfte in der Größenordnung zwischen 20 und 50 pMol Resorufin / mg mikrosomalen Proteins und Minute liegen, wie sie in den Lebern der unbehandelten (und der mit Fischöl bzw. Distelöl beimpften) Tiere im Versuch "Öle" ermittelt wurde. In dieser Größenordnung lagen auch die Aktivitäten einen Tag nach der Injektion von CB 77 (Versuche "CB 77/1" und "CB 77/2"). Dies ist genau der Bereich, den PLUTA (1991) für unbelastete Regenbogenforellen und Karpfen feststellte. (Leider gibt es bisher keine Angaben über MFO-Aktivitäten des Steinbutts.) Die höhere Aktivität der Kontrollen im Versuch "3 CBs" wird auf die kürzere Adaptationszeit im IfM zurückgeführt (vgl. 3.4.4).

Die MFO-Aktivitäten der fast fließend reifen weiblichen Fische waren auf deutlich unter 10 pMol Resorufin bzw. auf ca. 20 pMol Hydroxycumarin/ mg Protein \cdot Minute herabgesenkt, und ihre EROD wurde auch durch Chlorbiphenyl 77 nicht gesteigert (Versuch "CB 77/2").

Es ist bekannt, daß weibliche Fische, insbesondere kurz vor dem Ablaichen, geringere hepatische MFO-Aktivitäten als juvenile und männliche aufweisen (z.B. STEGEMANN & CHEVION, 1980; KOIVUSAARI et al., 1981; PLUTA, 1991). Der Unterschied betrifft nicht nur die Basisaktivitäten, sondern auch das Ausmaß der Induktion durch Schadstoffe (FÖRLIN, 1980; FÖRLIN et al., 1984). Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß Estradiol die MFO-Aktivität absenkt, während Testosteron sie - wenn überhaupt - eher steigert (FÖRLIN & HANSSON, 1982; STEGEMAN et al. 1982, VODICNIK & LECH, 1983, ANDERSSON, 1990). Umgekehrt wurden auch stimulierende Einflüsse durch PCB-Gemische auf den Geschlechtssteroidmetabolismus von Fischen nachgewiesen (ANDO & YANO, 1982, YANO & MATSUYAMA, 1986).

Eine wechselseitige Beeinflussung der durch MFOs vermittelten Metabolismen von Steroiden und Induktoren des 3-MC-Typs ist plausibel, da die Wirkungsmechanismen (zumindest im Säuger) frappierende Parallelitäten zeigen: Bindung an einen cytosolischen Receptor, Wanderung des Ligand-Receptor-Komplexes zum Kern, dort Übertragung auf einen zweiten Receptor und Bindung des Komplexes mit der Proteinseite an die DNA, Erhöhung der Transskription der DNA, dadurch Multiplikation der mRNA für wenigstens einige Cytochrom P-450-Isoenzyme (BRESNICK, 1978; WELFHÖNER, 1990).

Es ist demzufolge auch mit Wechselwirkungen nicht nur zwischen Geschlechtshormonen, angefangen beim Progesteron, sondern auch zwischen dem steroiden Stresshormon Cortisol und Xenobiotika zu rechnen. So fanden BYRNE et al. (1988) nach chronischer Belastung durch PCBs und PBBs eine Reduktion des Corticosteronspiegels im Rattenblut, die mit einer Schädigung der Nebennierenrinde einherging. Dagegen beobachteten ENGELHARDT et al. (1982) in Robben, deren Futter (Fische) künstlich mit Rohöl versetzt war, neben der zu erwartenden Induktion der Arylkohlenwasserstoffhydroxylase (AHH) eine deutliche Erhöhung der Cortisolspiegel. Dabei sank die Halbwertszeit des Cortisols von $1\frac{3}{4}$ auf 1 Stunde. Weiterhin stellten ILAN & YARON (1982) in Regenbogenforellen bei o,p-DDD-Exposition eine langfristige Erhöhung des Cortisolspiegels fest, der über dem kurzfristig durch Fang und Blutabnahme verursachten Stress-Niveau lag. Die biologische Halbwertszeit des Cortisols war gegenüber den Kontrollen um 370% verlängert, und noch nach 120 Tagen erhöhte neuerlicher Stress den Cortisolspiegel nicht weiter. Die beobachtete Steigerung der Cortisolspiegel im Blut der mit β -NF beimpften Steinbutts (Versuch "CB 77/1") ist demnach trotz der statistisch kaum beweiskräftigen Anzahl von Versuchstieren durchaus ernstzunehmen.

Fische sind poikilotherme Tiere; deshalb ist ihr Stoffwechsel in stärkerem Maße als derjenige der Säugetiere von der Umgebungstemperatur abhängig, und es ist dem Umstand zuzuschreiben, daß die Versuche in der wärmeren Jahreszeit durchgeführt wurden (min. 6°C, max. 16,7°C), daß ein Temperatureinfluß auf die Monooxygenase-Aktivitäten bzw. auf deren Induktion durch Xenobiotika hier nicht deutlich wurde. Derartige Einflüsse sind oft in Laborversuchen (z.B. STEGEMAN, 1979; KOIVUSAARI, 1983; GURUMURTHY & MANNERING, 1985; ANDERSSON & KOIVUSAARI, 1985; JIMENEZ, et al., 1987, 1988; JIMENEZ & BURTIS, 1988, 1989) und in Felduntersuchungen festgestellt worden (z.B. ERNST et al., 1986; PLUTA, 1991).

Die MFO-Aktivität ist auch vom Alter der Fische abhängig (CHEVION et al., 1977; FÖRLIN, 1980; PLUTA, 1991). Dieser Faktor wurde hier bewußt eliminiert, indem nur Fische einer Alters- und Größengruppe verwendet wurden.

Die beobachtete, sehr große Variabilität der MFO-Aktivitäten innerhalb einzelner Versuchsgruppen könnte teilweise auf genetische Heterogenität der Tiere zurückzuführen sein. So stellten PEDERSEN et al. (1975) erhebliche Unterschiede zwischen den Monooxygenase-Aktivitäten geographisch und genetisch distinkter Stämme der Regenbogenforelle fest. Die Autoren schränken jedoch ein, daß die Unterschiede nicht zwangsläufig genetisch bedingt gewesen sein müssen, sondern daß Unterschiede in der Hälterungsgeschichte der Fische, z.B. in der Nahrung, eine hinreichende Erklärung böten.

Die Ernährung ist, wie wiederholt angedeutet wurde, eine weitere wichtige Einflußgröße für die MFO-Aktivität. Dies belegen nicht nur Hungerexperimente (KATO & GILLETTE, 1965; ANDERSSON et al., 1985; JIMENEZ & BURTIS, 1988, 1989), sondern auch Versuche, in denen Einflüsse unterschiedlicher Futterzusammensetzungen getestet wurden (ANKLEY & BLAZER, 1988). CAMPBELL & HAYES (1974) geben einen Überblick über die Rolle wichtiger Nahrungsbestandteile (Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, Vitamine, Spurenelemente) auf das MFO-System.

Zwei in den Versuchen beobachtete, nicht im Einklang mit der Literatur stehende Tendenzen, die für sich betrachtet nicht einmal signifikant sind, nämlich leichte Erhöhungen der Aktivitäten beider MFOs nach 37 Tagen des mit CB 77 beimpften Fisches im Versuch "CB-77/1" und die nach einem Tag erhöhte EROD-Aktivität der mit CB 153 beimpften Fische (Versuch "3 CBs"), regen an zu einer kritischen Betrachtung der Versuche, aus denen die weitgehend akzeptierten quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) und entsprechend die Berechnung von 2,3,7,8-TCDD-Toxizitätsäquivalenten abgeleitet wurden (4.1).

4.1 ZUR AUSWAHL VON PCB-KONGENEREN FÜR DAS CHEMISCHE SCHADSTOFFMONITORING

Das ursprünglichste Ziel des Vorhabens bestand darin, die ökotoxikologische Relevanz von PCB-Kongeneren zu überprüfen, um eine Entscheidungsgrundlage zu gewinnen, welche Kongenere im Rahmen des chemischen Schadstoffmonitoring mit höchster Priorität zu erfassen sind.

Neuere ökotoxikologische Betrachtungen zur Bedeutung individueller Chlorbiphenyle basieren einerseits auf der Häufigkeit und Größenordnung des Auftretens der Kongenere in marinen Matrices, andererseits auf Daten über deren toxisches Potential (z.B. McFARLAND & CLARKE, 1989):

Als Datenbasis zur relativen mengenmäßigen Bedeutung von PCB-Kongeneren in marinen Matrices kann die parallel zu diesem Vorhaben durchgeführte Untersuchung von REUSCH (1991) zur PCB-Belastung der Kieler Bucht naturgemäß nicht mit der computergestützten Auswertung von zahlreichen entsprechenden Angaben in internationalen Literatur konkurrieren, wie sie McFARLAND & CLARKE (1989) vornahmen. Die Ergebnisse stimmen dennoch in den Grundzügen recht gut überein.

Die gängigen QSARs für PCBs (z.B. POLAND & KNUTSON, 1982; SAFE, 1984 und SAFE et al. 1982, 1985, 1986) basieren weitgehend auf der Bindungsaffinität an einen cytosolischen Ah-Receptor (auch "TCDD-Receptor" genannt) und auf der durch äquimolare Dosen nach 5-7 Tagen verursachten Induktion der AHH und/oder EROD in Hepatozyten von Laborstämmen von Kleinsäugetern (Ratten, Mäusen, Meerschweinchen) relativ zu den entsprechenden Werten für 2,3,7,8-TCDD. Die ermittelten Faktoren sind bei diesen Tieren relativ gut mit den Unterschieden im Auftreten TCDD-typischer Vergiftungssymptome korreliert, so daß sie zur Berechnung von 2,3,7,8-TCDD-Toxizitätsäquivalenten vorgeschlagen wurden. Das Produkt der Konzentration eines Kongeners mit seinem spezifischen TCDD-Vergleichsfaktor soll das toxische Potential dieses Kongeners, deren Summe das toxische Potential von Gemischen quantifizieren.

Das wesentliche Ergebnis dieser Beobachtungen war immer wieder, daß PCBs in beiden para-Positionen und in mindestens 2 meta-Positionen mit Chlor substituiert sein müssen, um eine ähnliche Reaktion wie TCDD hervorzurufen, während Chloratome in der ortho-Position mit wachsender Anzahl diese Reaktionen verhindern. Daraus wurde durchaus plausibel abgeleitet, daß eine mehr oder weniger strikte Planarität der Moleküle essentiell für eine dem TCDD vergleichbare Toxizität sei.

Die Giftigkeit der strukturell zur Planarität befähigten Kongenere soll hier nicht bezweifelt werden; es muß jedoch davor gewarnt werden, alle anderen, nämlich die nicht-planaren PCBs für harmlos zu halten. Schon die oben umrissene Methode, nach der die QSARs zustande kamen, hat einige Schwächen, die es als gefährlich erscheinen lassen, die Toxizität von PCBs ausschließlich am TCDD zu messen:

Bei den Versuchen, die den QSARs zugrundelagen, handelte es sich zumeist um Kurzzeitexperimente (in der Regel 5 oder 7 Tage) mit relativ hohen Dosen einzelner Kongenere:

- Das Ausmaß der MFO-Induktion ist aber zeit- und konzentrationsabhängig (z.B. ZHANG et al., 1990).
- DENOMME et al. (1986) weisen darauf hin, daß die Wechselwirkungen zwischen einzelnen PCBs und von PCBs mit anderen toxischen halogenierten Arylkohlenwasserstoffen
- bei (in Bezug auf die Induktion:) submaximalen Dosen bisher völlig unbekannt sind.
- z. B. in Fischen konnte ein cytosolischer Ah-Receptor bisher gar nicht nachgewiesen werden (DENISON et al., 1986), und es ist unklar, ob der entsprechende Receptor des Zellkerns (der letztlich für die Reaktion des Systems entscheidendere Receptor) in allen Fällen dieselbe Affinität für die einzelnen Kongenere hat wie der darauf untersuchte cytosolische.

Es kann also bezweifelt werden, ob die im Labor entwickelten Modelle für die Verhältnisse in der realen Umwelt signifikant sind, da möglicherweise schon Zeit- und Dosisabhängigkeiten der kongenerenspezifischen Receptorbindungs- und MFO-Induktionscharakteristika sich dort deutlich anders auswirken, und da die Kongenere in der Umwelt nicht isoliert, sondern stets in komplexen Gemischen vorliegen, so daß nach mehreren Hinweisen synergistische und antagonistische Effekte zu erwarten sind.

So beobachteten z.B. BANNISTER et al. (1986) in zwei Stämmen von Laborratten einen synergistischen Effekt von 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl (CB 153) auf die AHH- und EROD-Induktion durch TCDD. Dieses Chlorbiphenyl hat eine minimale Receptor-Bindungsaffinität und bewirkt selbst keine AHH- oder EROD-Induktion. Der synergistische Effekt, der nur bei TCDD-Dosen auftrat, die - einzeln appliziert - eine submaximale Induktion bewirken, kam dadurch zustande, daß eine 7-tägige Vorbehandlung mit dem Hexachlorbiphenyl die Konzentration des Ah-Receptorproteins vervielfachte.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen DENOMME et al. (1986), die feststellten, daß mehrere planare, EROD-induzierende PCB-Kongenere (mit hoher Bindungsaffinität für den cytosolischen Ah-Receptor) dessen Konzentration nicht steigerten, wohl aber mehrere nicht-planare Kongenere mit geringer Affinität für den Ah-Receptor. Auch hierbei spielten der Zeitpunkt der Probennahme sowie die Dosis eine wichtige Rolle, und die EROD-Induktion durch TCDD wurde im Sinne eines synergistischen Effekts gesteigert.

Als Beispiel für einen antagonistischen Effekt sei auf HAAKE et al. (1987) verwiesen, die eine deutliche Senkung der teratogenen Wirkung von TCDD bei gleichzeitiger Verabreichung mit Aroclor 1254 feststellten. Die Ursache für diesen Effekt vermuten die Autoren in der kompetitiven Bindung einiger Kongenere an den Ah-Receptor, die bei geringerer spezifischer Teratogenität die Receptorverfügbarkeit für das TCDD herabsetzte.

Der Wirkungsmechanismus dieser Xenobiotika wird oft mit dem der Steroide verglichen. POLAND & KNUTSON (1982) schließen aus dem Umstand, daß in einigen Geweben durch eine Reihe von Agonisten des Ah-Receptors sehr viel weitgehendere Folgen als die MFO-Induktion hervorgerufen werden, wie Zellteilung, -differenzierung bzw. -involution oder Atrophie, daß sich der Ah-Rezeptor nicht speziell für seine Rolle im Xenobiotika-Metabolismus entwickelt hat, sondern eher für die Steuerung dieser anderen Reaktionen. Dies impliziert, daß es irgendwann in der Evolution, oder auch gegenwärtig, einen (noch unbekannt) physiologischen Liganden gegeben habe oder gebe, der einen kurzfristigen Effekt ausüb(t)e. Die Toxizität der Xenobiotika beruhe vermutlich auf der Langfristigkeit der durch den Receptor gesteuerten Reaktionen. - Die Analogie eines derartigen physiologischen Liganden zu den Steroiden ist offensichtlich. Da das Reaktionsmuster auch auf Xenobiotika von Gewebe zu Gewebe deutliche Unterschiede aufweist, muß daran erinnert werden, daß nur ganz bestimmte Zellarten reich an hochaffinen Rezeptoren für ein bestimmtes Steroidhormon sind: da sich die Forschung über die Wirkungsmechanismen polyhalogener zyklischer Kohlenwasserstoffe im letzten Jahrzehnt zum weit überwiegenden Teil auf das 2,3,7,8-TCDD und diesem analoge Verbindungen in Hepatozyten beschäftigt hat, kann vermutet werden, daß ähnliche Rezeptoren mit anderen Bindungsaffinitäten ihrer Entdeckung harren. Es wurde darauf hingewiesen, daß z.B. in Fischen bisher kein cytosolischer Ah-Receptor gefunden wurde. Auch zum Mechanismus der Induktion des PB-Typs ist bisher praktisch nichts, jedenfalls kein Receptor, bekannt. Die Konzentrationssteigerung des hepatisch-cytosolischen Ah-Receptors durch PB-Induktoren unter den PCBs ist daher bisher rätselhaft.

Es gibt auch Hinweise auf strukturunabhängige, rein physikalische Formen der Toxizität (Narkose) der polychlorierten Biphenyle (SHAROM & MELLORS, 1980). Die Auswertung der parallel zu diesem Vorhaben in Geweben derselben Fische untersuchten Aktivitäten der Na^+ , K^+ - und Ca^{2+} -ATPasen ist leider noch nicht abgeschlossen, so daß derzeit leider noch unbekannt ist, ob die Struktur für die Wirkung von PCBs auf diese ATPasen eine Rolle spielt.

Es bleibt jedenfalls festzustellen, daß es falsch wäre, sich im chemischen Monitoring einseitig auf die planaren, EROD-induzierenden Kongenere zu konzentrieren, da deren tatsächliche Toxizität eindeutig auch von der gleichzeitigen Anwesenheit und Wirkung anderer Kongenere abhängt. Dies muß gleichzeitig heißen, daß eine einfache Summation von TCDD-Toxizitätsäquivalenten, die ja letztlich nur planare, EROD-induzierende Kongenere berücksichtigt, wenig über das reale toxische Potential aussagen kann.

In Ermangelung besserer Kriterien erscheint es darum vorläufig sinnvoll, weitestgehend der Auswahlempfehlung von McFARLAND & CLARKE (1989) zu folgen.

4.2 ZUR AUSSAGEKRAFT VON MFO-AKTIVITÄTEN IM RAHMEN DES BIOLOGISCHEN EFFEKTMONITORING

Reaktionen des hepatischen MFO-Systems werden, besonders in der meeresbiologischen Literatur der letzten Jahre, oftmals teleologisch als "Entgiftungsreaktionen" bezeichnet. Dazu stellt WELLHÖNER (1990) fest, daß Reaktionen des MFO-Systems primär nicht zielgerichtet sind, z.B. um die Wirksamkeit von Pharmaka oder Xenobiotika herabzusetzen oder ihre Wasserlöslichkeit zu erhöhen, sondern daß eine erhöhte Wasserlöslichkeit der Endprodukte der Biotransformation durch MFOs nur in der statistisch überwiegenden Zahl der Fälle eintrete.

Bezogen auf Schadstoffe im marinen Ökosystem, deren subletale Wirkung durch Bestimmungen von MFOs erfaßt werden soll, erscheint der Begriff "Entgiftung" besonders verfehlt: gerade die stärksten Induktoren der AHH und der EROD, wie das 2,3,7,8-TCDD und das 3,4,5,3',4',5'-Hexachlorbiphenyl, werden anscheinend kaum nennenswert biotransformiert, und es sind die erst durch Einwirkung von Monooxygenasen entstehenden reaktiven Epoxide einiger polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, die diese als ultimale Cancerogene wirken lassen. Mithin handelt es sich dort, wie z.B. bei der Transformation von Ethyl-Parathion (E605) zu Paraoxon, eher um "Giftungsreaktionen".

Zur physiologisch/toxikologischen Bewertung einer MFO-Induktion durch Pestizide stellt MORIARTY (1982) fest, es sei bei der Feststellung subletaler Effekte sorgfältig zwischen adaptiven Reaktionen des Tieres und Schädwirkungen zu unterscheiden. Er argumentiert - etwas zu verharmlosend - daß die Leber Insektizid-exponierter Tiere gelegentlich angeregt werde, Enzyme zu produzieren, die den Induktor abbauen; dadurch könne zwar eine Vergrößerung der Leber verursacht werden, diese Veränderung sei aber kaum als schädlicher Effekt zu werten, sondern eher als adaptive Reaktion auf die Umwelt, vergleichbar mit dem Zittern bei extremer Kälte. Beide Reaktionen erhöhten die Überlebenswahrscheinlichkeit, aber sie könnten auch negative Konsequenzen haben.

Zweifellos ist es dennoch sinnvoll und aufschlußreich, im Rahmen eines marinen biologischen Effektmonitoring - neben anderen Parametern - die Aktivitäten einiger Monooxygenasen aus der Fischleber zu bestimmen. Dabei steht eine schwerpunktmäßige Begrenzung auf die Arylkohlenwasserstoffhydroxylase (AHH) und/oder die 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), wie sie z. B. von HANSEN & ADDISON (1990) vorgeschlagen wird, im Widerspruch zum Befund von HANSEN et al. (1983), daß Aroclor 1254 (ein technisches PCB-Gemisch, welches in seiner Zusammensetzung den Gemischen in vielen Umweltproben relativ ähnlich ist) die 7-Ethoxycumarin-O-deethylase (ECOD) der Dorschleber deutlich, deren EROD aber nicht induziert.

Die von HANSEN & ADDISON (1990) aufgelisteten, diametral verschiedenen Reaktionen in den ECOD- und EROD-Aktivitäten einiger Fischarten auf den gleichen Induktor zeigen, daß es sinnvoll ist, mehrere Monooxygenasen parallel in unterschiedlich reagierenden Arten zu messen: Einerseits können die Monooxygenase-Aktivitäten zweier Fischarten, wie Flunder und Kliesche, wegen ihrer sehr unterschiedlichen Reaktionsmuster auf einen Induktor nicht unbedingt miteinander verglichen werden; andererseits können bestimmte Schadstoffe als Ursache einer MFO-Induktion ausgeschlossen werden, wenn z.B. die EROD und ECOD-Aktivitäten positiv miteinander korrelieren, wie es bei PLUTA (1991) der Fall war.

Es liegt auf der Hand, daß die Methoden zur Aktivitätsbestimmung vor ihrer Anwendung in laborübergreifenden Programmen nicht nur der Interkalibrierung, sondern auch der Standardisierung bedürfen. Da die als AHH-, EROD- oder ECOD-aktivitäten gemessenen Reaktionen des MFO-Systems anscheinend jeweils von mehreren Cytochrom P-450-Isoenzymen abhängig sind, erscheint es vorteilhaft - wenn auch deutlich aufwendiger - die einzelnen Isoenzyme zu quantifizieren.

Einige natürliche Einflußgrößen auf MFO-Aktivitäten lassen sich relativ leicht eliminieren, wie z. B. das Alter bzw. die Größe der Fische durch Verwendung einer Alters- bzw. Größenklasse. Ob Einflüsse von Geschlechtssteroiden durch Verwendung von juvenilen Tieren vollständig vermieden werden können, ist noch unklar.

Der Einfluß eventueller Temperaturunterschiede in größeren Beprobungsgebieten kann schwer abgeschätzt werden. In diesem Zusammenhang stellt sich wegen der bei einigen Fischen nachgewiesenen temperaturkompensatorischen Fähigkeiten des Systems (z.B. KOIVUSAARI, 1983) zudem die Frage, ob die Bestimmung eher stets bei konstanter Temperatur oder eher bei der jeweiligen Temperatur des Habitats erfolgen sollte.

Es steht zu befürchten, daß einzelne Faktoren schwer erfaßbar sind und die Aussagekraft zumindest von isoliert in See gemessenen MFO-Aktivitäten in Fischlebern limitieren:

Zwar bestimmte PLUTA (1991) die MFO-Aktivitäten von Fischen, die bei unterschiedlichen Salinitäten gehalten worden waren, mit dem Ergebnis, daß die Salinität keinen Einfluß habe. Physiologische Reaktionen euryhaliner Fische auf eine langsame Adaptation an eine veränderte Salinität sind jedoch schwerlich mit denen zu vergleichen, die durch starke kurzfristig-periodische Veränderungen bedingt werden, wie sie im Gezeitenbereich von Flußmündungen auftreten. Da die Osmoregulation von Knochenfischen wesentlich über das Cortisol gesteuert wird, sind durch dauerhaften Salinitätsstreß, wie allgemein durch Streß, deutliche Steigerungen im Spiegel dieses Steroids zu erwarten.

Es ist derzeit unbekannt, ob Erhöhungen des Cortisolspiegels auf Xenobiotika-induzierbare Monooxygenasen einwirken. Zumindest für geschlechtsreife Fische ist mit einer indirekten Kopplung über eine z.B. von CARRAGHER & SUMPTER (1990) festgestellte Suppression der Testosteron- bzw. Estradiolausschüttung zu rechnen.

Hungerzustände treten bei freilebenden marinen Fischen wohl eher ausnahmsweise auf. Es muß aber damit gerechnet werden, daß auch eine unterschiedliche Nahrungszusammensetzung der Fische gewisse Einflüsse auf die Aktivität von Monooxygenasen haben kann (vgl. 4).

Im Gegensatz zum tierischen Organismus können viele pflanzliche Zellen aromatische Ringsysteme aufbauen; aus marinen Algen sind sogar zahlreiche halogenierte aromatische Verbindungen bekannt (METZNER, 1973), die z.T. in nennenswertem Umfang exudiert werden. Bisher gibt es keinerlei Untersuchungen darüber, ob und inwieweit erhöhte hepatische Monooxidase-Aktivitäten von Fischen auf derartige Expositionen zurückführbar sein können.

PLUTA (1991) stellt fest: "Erhöhte MFO-Aktivitäten sind **eindeutige** Hinweise auf anthropogen bedingte Belastungen mit organischen Schadstoffen. Dies läßt sich schlüssig und zweifelsfrei nachweisen." - Diese Meinung mag zwar dem Bedarf nach verlässlichen Werkzeugen zur Verschmutzungsanalyse sehr entgegenkommen, wissenschaftlich ist sie jedoch angesichts der möglichen Komplikationen bisher kaum haltbar. Dies ändert nichts am prinzipiellen Nutzen, MFO-Aktivitäten bereits jetzt im Rahmen des biologischen Effektmonitoring einzusetzen - **eindeutige** Hinweise sind jedoch bisher kaum zu erwarten. Deshalb muß davor gewarnt werden, aus formalen positiven Korrelationen, die sich evtl. zwischen willkürlich ausgewählten, parallel gemessenen anthropogenen Umweltchemikalien (z.B. PCBs oder PAHs) und MFO-Aktivitäten feststellen lassen, zwangsläufig eine Kausalität abzuleiten. Schließlich können gerade niedrige MFO-Aktivitäten, wie JIMENEZ et al. (1990) zeigen konnten, die Folge einer hohen Belastung durch Xenobiotika sein, dann nämlich, wenn aufgrund eines bereits eingetretenen hepatotoxischen Effekts die Fähigkeit zur MFO-Induktion begrenzt ist. Außerdem müssen toxische Wirkungen von Xenobiotika sich nicht zwangsläufig in erhöhten MFO-Aktivitäten widerspiegeln; so fanden BOYCHUK et al. (1991) in Catostomus commersoni eine signifikante Induktion der AHH und der EROD durch CB 77 erst oberhalb 300 µg/kg Leber, während bereits bei 100 µg/kg Veränderungen der Blutchemie, z.B. eine Senkung des Thyroxinspiegels, zu beobachten war.

4.3 ZUR BELASTUNG DER STEINBUTTS IN DER AQUAKULTUR AN DER KIELER FÖRDE (BÜLK)

Hierzu kann keine definitive Antwort gegeben werden. Zwar war die PCB-Grundbelastung der Steinbutts in der Anlage (s. 2.2) im Vergleich zu der der freilebenden Arten in der Kieler Bucht (vgl. REUSCH, 1991) relativ gering, die erhöhten Ausgangsaktivitäten beider Monooxygenasen der erst kurz zuvor in das IfM verbrachten Steinbutts im Versuch "3 CBs" (vgl. 3.4) können jedoch möglicherweise auf eine Belastung durch nicht gemessene Schadstoffe, wie z. B. PAHs, zurückzuführen sein.

Gegen eine Beeinträchtigung der Steinbutts in der Bülker Aquakultureinrichtung sprechen ein relativ guter Fortpflanzungserfolg der Tiere und die offenbare Zufriedenheit der Kunden mit den dort produzierten Satzfishen, die aus einer großen Nachfrage ablesbar ist. Allerdings ist auch zu berücksichtigen, daß Steinbutts relativ robuste Fische sind, wie sich z.B. aus ihrer im Vergleich zu Flundern deutlich höheren Überlebensrate unter sommerlichem Temperaturstreß in den Versuchsaquarien ergibt (vgl. 2.1). Es kann also auch gefolgert werden, daß sich der Steinbutt wegen seiner relativ großen Toleranz gegen einige typische Krankheiten schlecht als Bioindikator eignet.

5. LITERATUR

- ADDISON, R.F.; ZINCK, M.E.; WILLIS, D.E. (1978): Induction of hepatic mixed-function oxidase (MFO) enzymes in trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding Aroclor 1254 or 3-Methylcholanthrene. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61C: 323-325
- AITIO, A. (1978): A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal. Biochem.*, 85: 488 - 491
- AITIO, A.; VAINIO, H. (1976): UDP glucuronosyltransferase and mixed function oxidase activity in microsomes prepared by differential centrifugation and calcium aggregation. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 39: 555 - 561
- ANDERSSON, T. (1990) Sex differences in cytochrome p-450-dependent xenobiotic and steroid metabolism in the mature rainbow trout kidney. *J. Endocr.*, 126: 9-16
- ANDERSSON, T; KOIVUSAARI, U. (1985): Influence of environmental temperature on the induction of xenobiotic metabolism by β -naphthoflavone in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 80: 43 - 50
- ANDERSSON, T.; KOIVUSAARI, U.; FÖRLIN, L. (1985a): Xenobiotic biotransformation in the rainbow trout liver and kidney during starvation. *Comp. Biochem. Physiol.* 82C: 221-225
- ANDERSSON, T.; PESONEN, M.; JOHANSSON, C. (1985b): Differential induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione transferase and UDP glucuronosyl transferase activities in the liver of the rainbow trout by β -naphthoflavone or Clophen A50. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 3309-3314

- ANDO, H.; YANO, T. (1982): Effects of PCB on sexual maturation in female medaka (Oryzias latipes). Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., 2: 79-82
- ANKLEY, G.T.; BLAZER, V.S. (1988): Effects of diet on PCB-induced changes in xenobiotic metabolism in the liver of channel catfish (Ictalurus punctatus). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45: 132 - 137
- BANNISTER, R.; MASON, G.; KELLEY, M.; SAFE, S. (1986): The effects of cytosolic receptor modulation on the AHH-inducing activity of 2,3,7,8-TCDD. Chemosphere, 15: 1909-1911
- BOYCHUK, R.J.; LOCKHART, W.L.; BROWN, S.B. (1991): Hepatic mixed-function oxidase enzymes in white suckers (Catostomus commersoni) over a seasonal cycle and following injection with PCB congener 77. Poster, 12th Annual SETAC Meeting, Seattle, 3-7 November 1991
- BRADFORD, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72: 248 - 254
- BRESNICK, E. (1978): The molecular biology of the induction of the hepatic mixed function oxidases. Pharmac. Ther., A2: 319-335
- BURKE, M.D.; MAYER, R.T. (1974): Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metab. Disp., 2: 583 - 588
- BYRNE, J.J.; CARBONE, J.P.; PEPE, M.G. (1988): Suppression of serum adrenal cortex hormones by chronic low-dose polychlorobiphenyl and polybromobiphenyl treatments. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 17: 47-53
- CAMPBELL, T.C.; HAYES, J.R. (1975): Role of nutrition in the drug-metabolizing enzyme system. Pharmacol. Reviews, 26: 171-197
- CARRAGHER, J.F.; SUMPTER, J.P. (1990): The effect of cortisol on the secretion of sex steroids from cultured ovarian follicles of rainbow trout. Gen. Comp. Endocr., 77: 403-407

- CHEVION, M.; STEGEMAN, J.J.; PEISACH, J.; BLUMBERG, W. (1977): Electron paramagnetic resonance studies on hepatic microsomal cytochrome P-450 from a marine teleost fish. *Life Sci.*, 20: 895-900
- CINTI, D.L.; MOLDEUS, P.; SCHENKMAN, J.B. (1972): Kinetic parameters of drug-metabolizing enzymes in Ca^{2+} -sedimented microsomes from rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 21: 3249 - 3256
- DENOMME, M.A.; LEECE, B.; LI, A.; TOWNER, R.; SAFE, S. (1986): Elevation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) rat hepatic receptor levels by polychlorinated biphenyls. Structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 35: 277-282
- DENISON, M.S.; WILKINSON, C.F.; OKEY, A.B. (1986): Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: comparative studies in mammalian and nonmammalian species. *Chemosphere*, 15: 1665-1672
- DUINKER, J.C.; SCHULZ, D.E.; PETRICK, G. (1988 a): Selection of chlorinated biphenyl congeners for analysis in environmental samples. *Mar. Poll. Bull.*, 19: 19-25
- DUINKER, J.C.; SCHULZ, D.E.; PETRICK, G. (1988 b): Multidimensional gas chromatography with electron capture detection for the determination of toxic congeners in polychlorinated biphenyl mixtures. *Anal. Chem.*, 60: 478-482
- ENGELHARDT, F.R. (1982): Hydrocarbon metabolism and cortisol balance in oil-exposed ringed seals, Phoca hispida. (*Comp. Biochem. Physiol.*, 72C: 133-136
- ERNST, W.; EDER, G.; GOERKE, H.; KILLER, K.; WEBER, K.; WEIGELT, S.; WEIGELT, V. (1986): Organische Umweltchemikalien in deutschen Ästuarien und Küstengewässern: Vorkommen, Biotransfer, Abbau. BMFT-Forschungsbericht, BMFT-FB M 86-001-Meeresforschung, 72 p.
- FÖRLIN, L. (1980): Effects of Clophen A50, 3-methylcholanthrene, pregnelonone-16 α -carbonitrile and phenobarbital on the hepatic microsomal cytochrome P-450 dependent monooxygenase system in rainbow trout, Salmo gairdneri, of different age and sex. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54: 420-430
- FÖRLIN, L.; HANSSON, T. (1982): Effects of oestradiol-17 β and hypophysectomy on hepatic mixed function oxidases in rainbow trout. *J. Endocr.*, 95: 245-252

- FÖRLIN, L.; ANDERSSON, T.; KOIVUSAARI, U.; HANSSON, T. (1984): Influence of biological and environmental factors on hepatic steroid and xenobiotic metabolism in fish: Interaction with PCB and β -naphthoflavone. *Mar. Environ. Res.*, 14: 47-58
- FÖRLIN, L.; ANDERSSON, T. (1985): Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P-450 and conjugating enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B: 569 - 572
- GOOCH, J.W.; ELSKUS, A.A.; KLOEPPER-SAMS, P.J.; HAHN, M.E.; STEGEMAN, J.J. (1989a): Effects of ortho- and non-ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic monooxygenase system in scup (Stenotomus chrysops). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 98: 422 - 433
- GOOCH, J.W.; FARRINGTON, J.W.; HUANG, S.; STEGEMAN, J.J. (1989b): Effects of removal of coplanar PCBs from an Aroclor mixture on the induction of hepatic monooxygenase activity in scup (Stenotomus chrysops). (Poster, 10th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Toronto, 28. 10. - 2. 11. 1989)
- GURUMURTHY, P.; MANNERING, G.J. (1985): Membrane bound cytochrome P-450 determines the optimal temperatures of NADPH-cytochrome P-450 reductase and scytochrome P-450-linked monooxygenase reactions in rat and trout hepatic microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 127: 571-577
- HANSEN, P.-D.; ADDISON, R.F.; WILLIS, D.E. (1983): Hepatic microsomal O-de-ethylases in cod (Gadus morhua): their induction by Aroclor 1254 but not ba Aroclor 1016. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74C: 173-175
- HANSEN, P.-D.; ADDISON, R.F. (1990): The use of mixed function oxidases (MFO) to support biological effects monitoring in the sea. *ICES C.M.* 1990/E:33, 9 p.
- JIMENEZ, B.D.; CIRMO, C.P.; MCCARTHY, J.F. (1987): Effects of feeding and temperature on uptake, elimination and metabolism of benzo(a)pyrene in the bluegill sunfish (Lepomis macrochirus). *Aquatic Toxicol.*, 10: 41-57
- JIMENEZ, B.D.; BURTIS, L.S. (1988): Response of the mixed-function oxidase system to toxicant dose, food and acclimation temperature in the bluegill sunfish. *Mar. Environ. Res.*, 24: 45 - 49

- JIMENEZ, B.D.; BURTIS, L.S.; EZELL, G.H.; EGAN, B.Z.; LEE, N.E.; BEAUCHAMP, J.J.; McCARTHY, J.F. (1988): The mixed function oxidase system of bluegill sunfish, Lepomis macrochirus: Correlation of activities in experimental and wild fish. Environ. Toxicol. Chem., 7: 623 - 634
- JIMENEZ, B.D.; BURTIS, L.S. (1989): Influence of environmental variables on the hepatic mixed-function oxidase system in bluegill sunfish, Lepomis macrochirus. Comp. Biochem. Physiol., 93C: 11 - 21
- JIMENEZ, B.D.; OIKARI, A.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E.; McCARTHY, J.F. (1990): Hepatic enzymes as biomarkers: interpreting the effects of environmental, physiological and toxicological variables. In: McCarthy, J.F.; Shugart, L.R. (eds.): Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, (Chapter 6:) pp. 123-142
- KATO, R.; GILLETTE, J.R. (1965): Effect of starvation on NADPH-dependent enzymes in liver microsomes of male and female rats. J. Pharmacol. Exp. Ther., 150: 279-284
- KLEINOW, K.M.; MELANCON, M.J.; LECH, J.J. (1987): Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. Environ. Health Perspect., 71: 105 - 119
- KLOTZ, A.V.; STEGEMAN, J.J.; WALSH, C. (1984): An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. Anal. Biochem., 140: 138 -145
- KOIVUSAARI, U. (1983): Thermal acclimatization of hepatic polysubstrate monooxygenase and UDP-glucuronyltransferase of mature rainbow trout. J. Exp. Zool., 227: 35-42
- KOIVUSAARI, U.; HARRI, H.; HANNINEN, O. (1981): Seasonal variation of hepatic biotransformation enzymes in female and male rainbow trout (Salmo gairdneri). Comp. Biochem. Physiol., 70C: 149-157
- KOIVUSAARI, U. (1983): Thermal acclimatization of hepatic polysubstrate monooxygenase and UDP-glucuronosyltransferase of mature rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Exp. Zool., 227: 35-42
- LOVE, R.M. (1970): The chemical biology of fishes. Academic Press, London & New York, 547 p.

- METZNER, H. (1973): Biochemie der Pflanzen. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 376 p.
- McFARLAND, V.A.; CLARKE, J.U. (1989): Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. Environ. Health Persp., 81: 225 - 239
- MONOD, G.; VINDIMIAN, E. (1991): Effect of storage conditions and subcellular fractionation of fish liver on cytochrome P₄₅₀-dependant enzymatic activities used for monitoring of water pollution. Water Res., 25: 173-177
- MORIARTY, F. (1982): Ecological implications of pesticides. In: Kaloyanova, F.; Tarkowski, S. (eds.): Health Aspects of Chemical Safety, Interim Document 9: Toxicology of Pesticides. WHO, Copenhagen, pp. 100-122
- PEDERSEN, M.G.; HERSHBERGER, W.K., ZACHARIAH, P.K., JUCHAU, M.R. (1975): Hepatic biotransformation of environmental xenobiotics in six strains of rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Fish. Res. Board Can., 33: 666-675
- PALSSON, P. (1981): Hochungesättigtes Phosphatidylcholin: subzelluläre Kinetik in vitro und in vivo und Einfluß auf Induktion und Temperaturabhängigkeit der mikrosomalen Monooxygenase. Dissertation, Kiel 1981, 414 Seiten
- PLUTA, H.-J. (1991): Untersuchungen zur Biotransformation ("Entgiftungsaktivität" der Mischfunktionellen Oxidasen, MFO) in der Fischleber. Abschlußbericht des Teilverhabens 3 zum UBA-FuE-Vorhaben "Fischkrankheiten im Wattenmeer". BGA, Berlin, 1991, 103 Seiten
- POLAND, A.; KNUTSON, J.A. (1982): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 22: 517-554
- POHL, R.J.; FOUTS, J.R. (1980): A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. Anal. Biochem., 107: 150 - 155
- PROUGH, R.A.; BURKE, M.D.; MAYER, R.T. (1978): Direct fluorometric methods for measuring mixed-function oxidase activity. In Fleischer, S.; Parker, L. (eds.): Methods in Enzymology, Vol. 52: Biomembranes, Part C: Biological Oxidations - Microsomal, Cytochrome P-450, and other Hemoprotein Systems. Academic Press, 1978, pp. 372 - 377

- REUSCH, T. (1991): Polychlorierte Biphenyle (PCB) in Wasser, Sediment und Organismen der Kieler Bucht unter besonderer Berücksichtigung der toxischen Komponenten. Diplomarbeit, Kiel 1991, 110 Seiten
- SABOROWSKI, R.; PETERS, G.; DASSLER-SCHNEIDER, M. (1989): Belastungsbedingte Primär- und Sekundäreffekte im Stoffwechsel des Steinbutts Scophthalmus maximus. Semesterarbeit, Kiel 1989, 44 Seiten
- SACHS, L. (1978): Angewandte Statistik - Statistische Methoden und ihre Anwendungen. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 4. Auflage, 552 p.
- SAFE, S.; PARKINSON, A.; ROBERTSON, L.; COCKERLINE, R.; SAFE, L.; BANDIERA, S.; OKEY, A. (1982): PCBs as AHH inducers. In: Hutzinger, O.; Frei, R.W.; Merian, E.; Pocchiari, F. (eds.): Pergamon Series on Environmental Science, Vol. 5: Chlorinated dioxins and related compounds. Pergamon Press, Oxford · New York · Toronto · Sidney · Paris · Frankfurt, pp. 383-392
- SAFE, S. (1984): Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology, and mechanism. CRC Critical Reviews in Toxicology, 13: 319-395
- SAFE, S.; BANDIERA, S.; SAWYER, T.; ROBERTSON, L.; SAFE, L.; PARKINSON, A.; THOMAS, P.E.; RYAN, D.E.; REIK, L.M.; LEVIN, W.; DENOMME, M.A.; FUJITA, T. (1985): PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. Environ. Health Perspect., 60: 47-56
- SAFE, S.; BANDIERA, S.; SAWYER, T.; ZMUDZKA, B.; MASON, G.; ROMKES, M.; DENOMME, M.A.; SPARLING, J.; OKEY, A.B.; FUJITA, T. (1986): Effects of structure on binding to the 2,3,7,8-TCDD receptor protein and AHH induction - halogenated biphenyls. Environ. Health. Perspect., 61: 21-33
- SCHNEIDER, R. (eingereichtes Manuskript): Organochlorines in tissues of Antarctic birds and seals: the role of neutral lipids in the toxokinetics of persistent lipophilic xenobiotics.
- SHAROM, F.J.; MELLORS, A. (1980): Effects of polychlorinated biphenyls on biological membranes - Physical toxicity and molar volume relationships. Biochem. Pharmacol., 29: 3311-3317

- SCHULTZ, D., PETRICK, G., & DUINKER, J.C. (1989): Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multi-dimensional gas chromatography - electron capture detection. *Environ. Sci. Technol.*, 23: 852 - 859
- SKAARE, J.U.; JENSEN, E.G.; GOKSÖYR, A.; EGAAS, E. (1991): Response of xenobiotic metabolizing enzymes of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to the mono-ortho substituted polychlorinated PCB congener 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, PCB-118, detected by enzyme activities and immunochemical methods. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 349-352
- STEGEMAN, J.J. (1979): Temperature influence on basal activity and induction of mixed-function oxygenase activity in Fundulus heteroclitus. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 36: 1400-1405
- STEGEMAN, J.J.; CHEVION, M. (1980): Sex differences in cytochrome P-450 and mixed function oxygenase activity in gonadally mature trout. *Biochem. Pharmacol.*, 29: 553-558
- STEGEMAN, J.J.; PAJOR, A.M.; THOMAS, P. (1982): Influence of estradiol and testosterone on cytochrome P-450 and monooxygenase activity in immature brook trout, Salvelinus fontinalis. *Biochem. Pharmacol.* 31: 17-24
- TANGEN, O.; JONSSON, J.; ORRENIUS, S. (1973): Isolation of rat liver microsomes by gel filtration. *Analyt. Biochem.* 54: 597-603
- VODICNIK, M.J.; LECH, J.J. (1983): The effect of sex steroids and pregnenolon-16 α -carbonitrile on the hepatic microsomal monooxygenase system of rainbow trout (Salmo gairdneri). *J. Steroid Biochem.*, 18: 323-328
- YANO, T.; MATSUYAMA, H. (1986): Stimulatory effect of PCB on the metabolism of sex hormones in carp hepatopankreas. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52: 1847-1852
- ZHANG, Y.S.; ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L. (1990): Induction of hepatic xenobiotic transformation enzymes in rainbow trout by β -naphthoflavone. Time-course studies. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 247-253

Annex 1

Weitere Details zu den verwendeten Methoden zur
Isolierung der mikrosomalen Fraktion der Leberzellen
und zur Bestimmung der Monooxidase-Aktivitäten

Tab. 1.1: Weitere Details zur Mikrosomen-Präparation

Verwendete Reagenzien

Kaliumchlorid (KCl)	Merck 7654	MG	74,56
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck 8382	MG	121,14
Saccharose	Merck 8418	MG	342,30
EDTA (Titriplex III)	Merck 8418	MG	372,24
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer	MG	154,30
Glycerol	Merck 4095		

Verwendete Lösungen

KCl,	0,15 M	11,184 g / l	aqua demin.	
Saccharose,	0,25 M	85,575 g / l	aqua demin.	
Tris-HCl, pH 7,6,	0,1 M	12,114 g / l	aqua demin.	
	+	HCl _{konz}	ad pH 7,6	
"Glyzerinpuffer"	1	mM EDTA	372,2 mg	
	+	1	mM DTT	154,3 mg
	+	20	% Glycerol	200 ml
	+	0,1	M Tris-HCl (s.o.!) ad 1	1

Verwendete Geräte

Potter-Elvehjem-Homogenisator

Ultrazentrifuge: KONTRON TGA-65
Rotor TFT 70.38

Spektralphotometer: KONTRON UVIKON 710

Spektralfluorometer: KONTRON SFM 25 (mit Quartzküvetten!)

Tab. 1.2: Weitere Details zur Bestimmung der ECOD-Aktivität

Reagentien für die Bestimmung der 7-Ethoxycumarin-O-deethylase

Glucose-6-Phosphat	G-6-P- Na_2 , 77%, Boehringer 127647, 5g, MG 304,2
G-6-P-Dehydrogenase	G-6-P-DH, Grad II, Hefe, 5 mg / ml mit ca. 140 U/mg, Boehringer 737232, 25 mg/ 5 ml
7-Ethoxycumarin	Sigma E-1379, 500 mg, MG 190,2
7-Hydroxycumarin	(Umbelliferon) Sigma U-7626, 10 g, MG 162,1
β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP)	Sigma N-0505, 100 mg, MG 833,4
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck 8382, MG 121,14
Kaliumchlorid	KCl, Merck 4933, MG 74,56
Magnesiumchlorid	MgCl_2 , Merck 5833, MG 203,3
Trichloressigsäure	(TCA), Merck 807, MG 163,39

Lösungen für die ECOD-Bestimmung nach AITIO / PALSSON(1) für NADPH-regenerierendes System (2) ansetzen:

Tris-HCl, pH 7,6	0,1 M	12,114 g/l aqua demin.
KCl	0,155 M	1,156 g/100 ml
MgCl_2	0,1 M	2,033 g/100 ml

(2) NADPH-regenerierendes System (für 20 Proben):

<u>Substanz/Lösung</u>	<u>Konz. i. d. Inkubation</u>	<u>Zugabe</u>
NADP	4,3 mg	0,5 mM
G-6-P	15,8 mg	4 mM
Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,6	1,5 ml	55 mM
KCl, 0,155 M	1,5 ml	23,25 mM
MgCl_2 , 0,1 M	0,5 ml	5 mM
Aqua bidest.	0,5 ml	
G-6-P-DH	25 μ l	ca 1,75 U/ml

(3) weitere Lösungen:

7-Ethoxycumarin	1 mM	9,51 mg / 50 ml Tris-HCl
Trichloressigsäure	5 % (W/V)	5 g / 100 ml
Tris-HCl, pH 10,3		9,5 g / 100 ml

(4) Eich-Lösung: (Produkt = 7-Hydroxycumarin = Umbelliferon)

Stammlösung:	1 mM	(16,21 mg/100 ml Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,6) (lichtgeschützt bei Raumtemperatur lagern)
Grundverdünnung:	5 μ M	(50 μ l Stamm / 10 ml Tris-HCl, pH 7,6)

Tab. 1.3: Weitere Details zur Bestimmung der EROD-Aktivität

Reagentien für die Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase

Glucose-6-Phosphat	G-6-P- Na_2 , 77%, Boehringer, Nr.127647, 5g, Mg. 304,2
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	G-6-P-DH, Grad II, Hefe Boehringer, Nr. 7372325, mg/ml mit ca.140 U/mg
Ethoxyresorufin	Sigma, No.: E 8756, 5 mg, Mg. 241,2
NADPH	Sigma, No.: N 1630, 100 mg, Mg. 833,4
Methanol Uvasol R	Merck: Art. 6000, 1 l
Resorufin	Sigma, No.: R 3257, 5 g, Mg. 235,2

Lösungen für EROD-Bestimmung nach Pohl & Fouts/Palsson

0,1 M	Glucose-6-Phosphat	0,01521 g/500 μl (10 Proben à 50 μl)
0,1 M	Natrium-Phosphat-Puffer (NaPP), pH 7,8	
	I. 0,1 M Na_2HPO_4 + 2 H_2O	17,80 g/l
	II. 0,1 M NaH_2PO_4 + H_2O	1,38 g/100 ml
	mit beiden Lösungen den pH-Wert einstellen	
175 U	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (5 mg/ml mit ca.140 U/mg)	1 : 4 mit NaPP pH 7,8 verdünnen
150 μl	Ethoxyresorufin in Ethanol	0,361 mg/10ml
10 mg/ml	Mikrosomen-Suspension (Konz. mit pH 7,8 NaPP einstellen)	
1 mM	NADPH	0,00083g/ml NaPP pH 7,8

Eich-Lösung:

Stammlösung: 0,01 mM Resorufin in Ethanol (0,235 mg / 100 ml)

Zur Eichung wurde jeweils eine Verdünnungsreihe der Resorufin-Lösung gemessen. Aus der linearen Regression der Standard-Messungen wurden, nach Subtraktion der Reagenzienblindwerte die in den Bestimmungsansätzen entstandenen Produktkonzentrationen berechnet. Diese Konzentrationen wurden über die Konzentration mikrosomalen Proteins im Ansatz und die Inkubationszeit umgerechnet als spezifische Aktivität (in pMol Produkt / mg Protein und Minute). Über den jeweiligen Gehalt der Leber an mikrosomalem Protein und das jeweilige Gewicht der Leber wurden diese Daten zusätzlich auf die Gewichtseinheit (g Leber) und die gesamte Leber umgerechnet. (Gilt auch für ECOD)

Annex 2

Ergebnistabellen zu den einzelnen Versuchen

Tab. 2.1: Körpermaße der einzelnen Steinbutts im Versuch "Öle" und spezifische Aktivitäten der 7-Ethoxyresorufin- (EROD) und 7-Ethoxycumarin-O-deethylase (ECOD) der Lebern

Behandlung	Fischlänge [cm]	Fischgewicht [g]	Lebergewicht [g]	LSI [Lgew*100/Fgew]	ms Protein [mg/g Leber]	EROD-Aktivität [pM/mg P*min]	EROD-Aktivität [nM/g Leb*h]	EROD-Aktivität [nM/Leber*h]	ECOD-Aktivität [pM/mg P*min]	ECOD-Aktivität [nM/g Leb*h]	ECOD-Aktivität [nM/Leber*h]	FCOD/EROD- Verhältnis
unbehandelt	26	404	6,78	1,68	5,50	50	16,6	112	26	8,4	57	0,51
"	30	398	7,80	1,96	5,32	26	8,4	65	32	10,2	80	1,22
"	29	406	7,06	1,74	7,33	30	13,1	93	31	13,8	97	1,05
"	29	496	7,89	1,59	7,67	22	10,2	81	29	13,2	104	1,29
Fischöl	29	530	5,93	1,12	8,60	6	3,1	19	8	3,9	23	1,25
"	29	460	7,39	1,61	3,18	12	2,3	17	24	4,6	34	1,98
"	30	455	7,72	1,70	3,57	39	8,4	65	7	1,4	11	0,17
"	26	350	5,00	1,43	5,24	49	15,5	77	26	8,3	41	0,54
Distelöl	30	500	7,77	1,55	4,11	58	14,2	111	28	6,8	53	0,48
"	28	400	5,78	1,45	3,39	35	7,0	41	25	5,0	29	0,71
"	30	500	7,02	1,40	6,58	13	5,3	37	27	10,6	74	2,00
"	28	410	5,33	1,30	6,17	23	8,6	46	15	5,4	29	0,63

LSI = Leber-Somatischer Index [Lebergewicht * 100 / Fischgewicht]

ms Protein = mikrosomaler Proteingehalt der Leber

[pM/mg P*min] = [pMol Produkt / mg mikrosomalen Proteins * Minute]

[nM/g L*h] = [nMol Produkt / g Leber * Stunde]

[nM/g Leb*h] = [nMol Produkt / g Leber * Stunde]

Tab. 2.2: Körpermaße, hepatische EROD- und ECOD-Aktivitäten und Chlorbiphenyl-77-Gehalte sowie Cortisolspiegel der Steinbutts im Versuch "CB 77/1"

Behandlung	Dauer [Tage]	Fischlänge [cm]	Fischgewicht [g]	Lebergewicht [g]	LSI [Lgew*100/Fgew]	EROD-Aktivität [pM/mg P*min]	ECOD-Aktivität [pM/mg P*min]	CB 77-Gehalt [ng/g Leber]	Cortisol [ng/ml Blutserum]
CB 77	(1 h)	29	405	5,35	1,32	43	102	40	21
CB 77	1	25	305	7,87	2,58	49	112	130	26
CB 77	3	24	280	3,7	1,32	28	64	860	4
CB 77	4	27	315	4,53	1,44	61	86	180	16
CB 77	5	26	315	3,69	1,17	109	128	250	6
CB 77	6	27	290	3,54	1,22	77	120	140	(nicht analysiert)
CB 77	7	26	320	4,06	1,27	79	76	260	4
CB 77	14	28	385	7,29	1,89	74	92	260	(nicht analysiert)
CB 77	37	25	250	4,82	1,93	167	164	40	(nicht analysiert)
Fischöl	3	27	340	2,78	0,82	147	154	10	3,5
Fischöl	5	28	370	4,18	1,13	42	66	9	1,9
Fischöl	7	28	350	3,19	0,91	84	124	7	3
β-NF	1	28	405	4,8	1,19	188	163	1	1,9
β-NF	3	26	290	2,2	0,76	348	266	11	2,7
β-NF	5	26	300	5,4	1,80	204	141	6	9
β-NF	7	28	340	9,14	2,69	313	203	1	33

LSI = Leber-Somatischer Index [Lebergewicht * 100 / Fischgewicht]

ms Protein = mikrosomaler Proteingehalt der Leber

[pM/mg P*min] = [pMol Produkt / mg mikrosomalen Proteins * Minute]

Versuch "CB 77/1"

Tab. 2.3: Körpermaße und hepatische EROD- und ECOD-Aktivitäten der Steinbutts im Versuch "CB 77/2" (arithmetrische Mittelwerte und Standardabweichungen)

Juvenile Fische (je 3 Tiere / Versuchsdauer)													
Behandlung mit:	Dauer [Tage]	Länge [cm]	Gewicht [g]	Lebergewicht [g]	LSI [lgew.*100/fgew]	ms Protein [mg /g Leber]	EROD-Aktivität [pM/mg P*min]	EROD-Aktivität [nM/g L*h]	EROD-Aktivität [nM/Leber*h]	ECOD-Aktivität [pM/mg P*min]	ECOD-Aktivität [nM/g L*h]	ECOD-Aktivität [nM/Leber*h]	ECOD/EROD-Verhältnis
CB 77	1	28,3	438	5,18	1,18	6,97	50	19,9	100	92	37,2	188	1,93
(±)		0,5	15	0,77	0,14	0,89	19	5,7	23	27	7,4	24	0,21
CB 77	3	27,3	393	6,58	1,64	5,35	103	36,5	240	103	33,7	218	1,63
(±)		0,5	33	2,20	0,42	0,77	80	32,7	208	11	8,5	75	0,87
CB 77	5	27,7	388	5,40	1,39	6,23	172	63,0	329	125	46,2	245	0,82
(±)		0,5	6	0,62	0,16	0,32	74	25,5	122	34	11,1	51	0,23
β-NF =4)	5	28,0	428	8,52	1,97	5,58	365	119,4	975	252	82,8	678	0,70
(±)		1,2	71	3,38	0,56	0,42	134	38,4	331	85	24,1	225	0,03
Weibliche Fische (je 1 Tier / Versuchsdauer)													
Behandlung mit:	Dauer [Tage]	Länge [cm]	Gewicht [g]	Lebergewicht [g]	LSI [lgew.*100/fgew]	ms Protein [mg /g Leber]	EROD-Aktivität [pM/mg P*min]	EROD-Aktivität [nM/g L*h]	EROD-Aktivität [nM/Leber*h]	ECOD-Aktivität [pM/mg P*min]	ECOD-Aktivität [nM/g L*h]	ECOD-Aktivität [nM/Leber*h]	ECOD/EROD-Verhältnis
CB 77	1	29,0	480	12,5	2,60	6,68	4	1,5	19	17	7,0	87	4,59
CB 77	3	27,0	415	11,5	2,77	6,08	3	1,2	14	19	6,9	79	5,74
CB 77	5	28,0	405	12,6	3,12	6,70	4	1,6	20	21	8,3	104	5,09

LSI = Leber-Somatischer Index [Lebergewicht * 100 / Fischgewicht]

[pM/mg P*min] = [pMol Produkt / mg mikrosomalen Proteins * Minute]

[nM/g L*h] = [nMol Produkt / g Leber * Stunde]

ms Protein = mikrosomaler Proteingehalt der Leber

[nM/g L*h] = [nMol Produkt / g Leber * Stunde]

Tab. 2.4: Körpermaße und hepatische EROD- und ECOD-Aktivitäten juveniler Steinbutts im Versuch "3 CBs" (arithmetrische Mittelwerte ± Standardabweichungen, n=4)

Behandlung	Dauer [Tage]	Fischlänge [cm]	Fischgewicht [g]	Lebergewicht [g]	LSI [Lgew*100/Fqew]	ms Protein [mg/g Leber]	EROD-Aktivität [pM/mg P*min]	EROD-Aktivität [nM/q L*h]	EROD-Aktivität [nM/Leber*h]	ECOD-Aktivität [pM/mg P*min]	ECOD-Aktivität [nM/q L*h]	ECOD-Aktivität [nM/Leber*h]	ECOD/EROD-Verhältnis
Kontrolle	0	24,5	274	5,02	1,80	7,83	221	103	509	152	70	354	0,68
		0,5	20	1,86	0,55	0,93	17	11	159	50	23	170	0,20
Fischöl	1	24,0	268	3,94	1,44	8,69	169	88	339	184	96	368	1,09
		0,7	39	1,22	0,22	0,22	21	10	83	56	29	122	0,27
Fischöl	7	25,0	300	6,83	2,28	7,39	150	68	441	151	68	428	0,99
		1,2	32	1,12	0,30	0,50	45	26	106	70	35	164	0,41
CB 77	1	24,8	293	6,08	2,07	9,19	189	104	632	215	113	608	1,08
		0,4	17	1,20	0,33	1,09	47	27	229	165	79	297	0,63
CB 77	7	24,5	280	5,00	1,78	8,29	195	97	475	202	98	475	1,04
		1,1	37	1,17	0,30	0,50	42	23	111	86	34	140	0,40
CB 118	1	25,0	287	5,70	1,99	8,09	239	116	642	122	61	328	0,50
		1,6	31	1,38	0,43	0,91	42	26	126	56	32	140	0,17
CB 118	7	25,0	273	4,92	1,77	8,78	181	96	470	169	89	432	0,90
		0,7	47	1,31	0,27	0,36	53	31	221	67	37	236	0,18
CB 153	1	24,8	285	5,04	1,77	7,24	251	102	518	147	74	383	0,68
		0,8	18	0,32	0,14	2,48	53	27	138	103	49	256	0,50
CB 153	7	24,5	288	5,61	1,97	8,13	156	76	426	162	80	441	1,04
		0,5	28	0,23	0,18	0,49	18	8	45	59	31	157	0,39
β-NF	7	24,5	310	6,55	2,14	7,60	436	202	1264	229	110	652	0,50
		0,9	42	1,43	0,48	1,03	76	61	224	109	69	269	0,14

LSI = Leber-Somatischer Index [Lebergewicht * 100 / Fischgewicht]

ms Protein = mikrosomaler Proteingehalt der Leber

[pM/mg P*min] = [pMol Produkt / mg mikrosomalen Proteins * Minute]

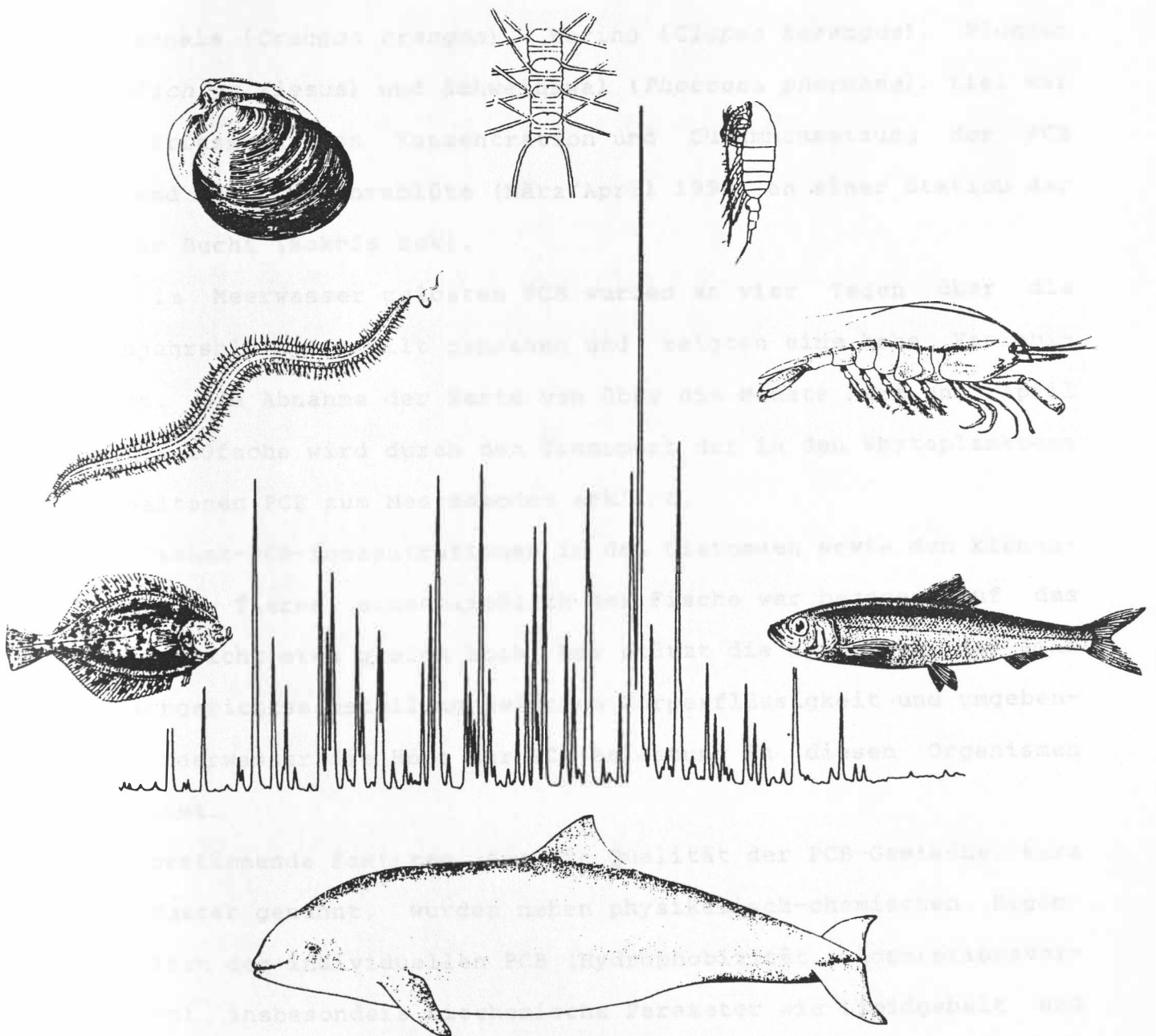
[nM/g L*h] = [nMol Produkt / g Leber * Stunde]

Annex 3

Kurzfassungen von Arbeiten mit Bezug zum Vorhaben,
die von Mitarbeitern anderer Abteilungen des IfM
unter Unterstützung durch den wissenschaftlichen
Mitarbeiter dieses Vorhabens durchgeführt wurden

POLYCHLORIERTE BIPHENYLE (PCB) IN WASSER, SEDIMENT
UND ORGANISMEN DER KIELER BUCHT UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER TOXISCHEN KOMPONENTEN

Diplomarbeit aus dem Institut für Meereskunde
an der Universität Kiel
vorgelegt von Thorsten Reusch, Kiel 1991



ZUSAMMENFASSUNG

Die Konzentrationen von 41 individuellen Polychlorierten Biphenylen (= PCB) wurden mit Hilfe von hochauflösender Gaschromatographie in Verbindung mit einem Elektroneneinfangdetektor in Wasser, Sediment und folgenden Organismen der Kieler Bucht bestimmt: Diatomeen, Copepoden, Islandmuschel (*Arctica islandica*), Borstenwurm (*Nephtys spec.*), Nordseegarnele (*Crangon crangon*), Hering (*Clupea harengus*), Flunder (*Platichthys flesus*) und Schweinswal (*Phocoena phocoena*). Ziel war die Erfassung von Konzentration und Zusammensetzung der PCB während der Frühjahrsblüte (März/April 1990) an einer Station der Kieler Bucht (Boknis Eck).

Die im Meerwasser gelösten PCB wurden an vier Tagen über die Frühjahrsblüte verteilt gemessen und zeigten eine hohe Variabilität. Die Abnahme der Werte von über die Monate März und April um das 10fache wird durch den Transport der in den Phytoplanktern enthaltenen PCB zum Meeresboden erklärt.

Die Gesamt-PCB-Konzentrationen in den Diatomeen sowie den kiemenatmenden Tieren einschließlich der Fische war bezogen auf das Lipidgewicht etwa gleich hoch. Das stützt die Hypothese, daß eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Körperflüssigkeit und umgebendem Meerwasser die Höhe der PCB-Belastung in diesen Organismen bestimmt.

Als bestimmende Faktoren für die Qualität der PCB-Gemische, kurz PCB-Muster genannt, wurden neben physikalisch-chemischen Eigenschaften der individuellen PCB (Hydrophobizität, Adsorptionsverhalten) insbesondere biochemische Parameter wie Lipidgehalt und

Lipidzusammensetzung in den Organismen sowie der enzymatische Abbau (Biotransformation) bestimmter PCB in den Organismen gefunden.

Es zeigte sich, daß physikalisch-chemische Eigenschaften, und hier vor allem die Lipidlöslichkeit, Konzentration und Muster der PCB in den unbelebten Kompartimenten Wasser und Sediment bestimmen. Die Metabolisierung von Kongeneren mit bestimmten Strukturmerkmalen verändert das PCB-Muster in den Meerestieren und zwar umso mehr, je größer die physiologische Leistungsfähigkeit der Art ist. Als sehr hilfreich für die Interpretation der PCB-Muster erwies sich die von BOON et al. (1989) aufgestellte Beziehung zwischen der Molekülstruktur und Metabolisierbarkeit: Benachbarte H-Atome möglichst in in *meta*- und *para*-Position sind die Voraussetzung für eine Biotransformation der betreffenden PCB in den Organismen.

Diejenigen PCB, die eine dem Tetrachlor-Dibenzo-p-Dioxin (= Seveso-Dioxin) ähnliche Toxizität aufweisen, wurden mit der Multidimensionalen Gaschromatographie bestimmt. Von diesen Komponenten konnten das Chlorbiphenyl 126 gar nicht und CB 77 nur in Einzelfällen, die CB 105, 118 und 156 aber in allen Proben gefunden werden.

Eine Summierung der TCDD-Äquivalente im Hering zeigt, daß CB 105 etwa 90% zur Toxizitäts-Summe beiträgt, während CB 77 keinen nennenswerten Einfluß auf die TCDD-Äquivalente hat. Eine Heringsmahlzeit von 200 g Filet würde bei einem Konsumenten von 70 kg die tägliche duldbare Aufnahme von TCDD-Äquivalenten (Richtwert Bundesgesundheitsamt) um das 1,7-4,3fache überschreiten.

a. Zusammenfassung

An 40 stündige Experimentelle Lehrveranstaltung zur Erklärung der physiologischen Reaktionen des Steinbutts Scophthalmus maximus unter Belastungsbedingungen zur Erklärung der Bedeutung des Stresshormons Cortisol als Indikator für die Belastung des Fisches.

BELASTUNGSBEDINGTE PRIMÄR- UND SEKUNDÄREFFEKTE IM STOFFWECHSEL DES STEINBUTTS SCOPHTHALMUS MAXIMUS

Die Belastungsreaktion des Steinbutts Scophthalmus maximus wurde in den ersten zwei Stunden des Belastungsversuchs mit den Methoden der respirometrischen Gasanalyse und der Bestimmung des Stresshormons Cortisol im Plasma und in der Leber untersucht.

Semesterarbeit

im

Biologisch-Meereskundlichen Großpraktikum II

(Sommersemester 1989)

am Institut für Meereskunde, Kiel

vorgelegt von : Reinhard Saborowski
Gerrit Peters
Martina Daßler-Schneider

Betreuung : Dr. habil. F. Buchholz, Abt. Zoologie
Dr. R. Schneider, Abt. Fischereibiologie

6. Zusammenfassung

An 40 Steinbutts (Scophthalmus maximus) wurden Untersuchungen zur Hormonphysiologie vorgenommen, wobei die Bedeutung des Steroidhormons Cortisol als Indikator für physiologische Belastungen untersucht wurde. In zwei Hälterungsansätzen wurden die Tiere unterschiedlichen physiologischen Belastungen (Hunger, erniedrigter Salzgehalt) ausgesetzt. Ein dritter Hälterungsansatz diente als Kontrolle und zur Ermittlung tagesrhythmischer Schwankungen. Die physiologischen Wirkungen des Hormons auf Hämatokrit, Leukokrit, Blut-Glucose, -Lipid, -Protein, Leber-Glycogen, -Lipid, -Protein und Muskel-Glycogen, -Protein wurden untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Der Cortisolgehalt des Blutes weist eine circadiane Rhythmik auf mit einem Maximum in den Morgenstunden. Die Werte liegen zwischen 1,5 und 35,5 ng/ml Serum.
- Glucose- und Lipidgehalt des Blutes weisen ebenfalls eine Tagesrhythmik mit zwei Maxima (9:00 u. 21:00) auf.
- Leber-Glycogen zeigt ein Maximum um 15:00 und ein Minimum um 9:00.
- Muskel-Glycogen zeigt ein Maximum gegen 9:00 und ein Minimum gegen 3:00. Muskel-Protein dagegen hat ein Maximum um 15:00 und ebenfalls ein Minimum um 3:00.
- Die Hämatokritwerte laufen parallel zu den Cortisolwerten.
- Beim Hungerversuch konnten aufgrund einer transportbedingten Belastung der Versuchstiere keine eindeutigen Tendenzen festgestellt werden, jedoch ist bei Leber-Protein und Muskel-Protein ein Absinken der Werte über den Versuchszeitraum erkennbar.
- Veränderungen der untersuchten Parameter stellten sich beim Salzversuch während des Versuchsbeginns

ein, als der Salzgehalt des Hältrungswassers erniedrigt wurde. Im weiteren Verlauf pendelten sich die Werte wieder weitgehend auf den Anfangswert ein. Ein Absinken wurde beobachtet bei Hämatokrit, Leukokrit und Serum-Glucose. Einen Anstieg zeigten Serum-Lipid und Leber-Lipid. Indifferent verhielten sich Cortisol, Serum-Protein, Leber-Protein und -Glycogen sowie Muskel-Glycogen. Der Muskel-Proteingehalt verzeichnet einen ständigen Anstieg während des Versuchs.

- Durch Korrelationen zwischen Cortisol und einigen Serum- und Gewebeparametern konnten allenfalls Tendenzen, aber keine eindeutigen Beziehungen festgestellt werden.
- Da Cortisol auf vielerlei Veränderungen der Umgebung reagiert, läßt es sich nur schwer als Indikator für eine bestimmte Belastung des Tieres oder eine bestimmte Schadstoffwirkung heranziehen.