

FISCH UND UMWELT

Entgiftungsstoffwechsel der Nordsee-Kliesche (*Limanda limanda*)

H.-J. Kellermann und M. Vobach, Institut für Fischereiökologie, Hamburg

Die Überwachungsprogramme der verschiedenen Übereinkommen zum Schutz der Meeresumwelt (wie HELCOM, OSPARCOM) fordern verstärkt das Biologische Effekt-Monitoring. In diesem Zusammenhang wird im Institut für Fischereiökologie als Biomarker für die Exposition gegenüber bestimmten organisch-chemischen Schadstoffen wie Polychlorierten Biphenylen (PCBs) die Messung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) - Aktivität in Lebern von Fischen durchgeführt. Die EROD-Aktivitäten in Lebern von 687 Klieschen, die zu unterschiedlichen Jahreszeiten in den Jahren 1995 und 1996 auf vier „Walther Herwig III“ - Forschungsreisen in der Nordsee gefangen wurden, sind, getrennt nach Geschlechtern, statistisch ausgewertet worden. Die logarithmierten Werte der EROD-Aktivität folgen in etwa einer Normalverteilung. Sie zeigen eine recht breite Verteilung, so daß regional oder zeitlich bedingte geringe Unterschiede bei kleinen Probenumfängen nicht auffallen. Vergleicht man die Aktivitäten in verschiedenen Gebieten der Nordsee, so wurden teilweise signifikante Unterschiede aufgezeigt. Inwieweit die EROD-Aktivitäten durch Schadstoffe oder durch saisonale Faktoren wie Laichzyklus beeinflusst werden, bedarf noch weitergehender Untersuchungen. Eine an der Biologischen Anstalt Helgoland entwickelte modellhafte Beschreibung saisonaler Schwankungen könnte bei der Interpretation hilfreich sein.

Einleitung

Organismen sind bestrebt, unerwünschte Stoffe wieder auszuscheiden. Allerdings ist solch eine Entgiftung oftmals nur nach komplexen chemischen Umwandlungen möglich. Cytochrom P450-Monooxygenasen, Enzymsysteme aus der Gruppe der Mischfunktionellen Oxygenasen (MFO), sind in der Lage, eine Reihe von organischen Schadstoffen zu metabolisieren. Durch Hydroxylierung werden die Schadstoffe in eine ausscheidbare Form überführt. Planare, aromatische Moleküle wie einige PCB-Kongenere führen zur Induktion des Cytochrom P450IA-Enzymsystems, das die „Entgiftung“ vornimmt. Dieses Enzym ist überwiegend im Endoplasmatischen Reticulum der Leberzellen lokalisiert und kann mit Hilfe von 7-Ethoxyresorufin als Substrat gemessen werden. Daher rührt auch der Name dieser Enzymaktivität, EROD. Eine hohe EROD-Aktivität sollte somit eine hohe Belastung mit bestimmten Schadstoffen anzeigen, d.h. die EROD-Aktivität könnte als Biomarker für das Biologische Effekt Monitoring geeignet sein.

Methodische Anmerkungen

In den Jahren 1995 und 1996 wurden auf zwei Sommer- und zwei Winterreisen mit FFS „Walther Herwig III“ Klieschenleberproben gesammelt und die EROD-Aktivität bestimmt. Beprobte wurden über die ganze Nordsee verteilte eingegrenzte kleine Gebiete. Ziel war es, einen ersten Einblick in den

Oxidative drug metabolising enzymes in North Sea dab (*Limanda limanda*)

In the framework of monitoring programmes organized under several sea protection conventions (HELSINKI Conv., OSPAR Conv.) the contracting parties are requested to develop appropriate techniques for Biological-Effect-Monitoring. In following these recommendations the Institut for Fisheries Ecology studies the 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in the liver of dab. EROD represents one enzyme of the cytochrome P-450 species, also called mixed function oxygenases (MFO), which is induced by certain organic contaminants, e.g. PCBs. On the other hand, an influence of natural factors like season, temperature or spawning on the EROD activity may be possible. The present study represents an insight into the status of the EROD activity in North Sea dab. Ultimately, we intend to decide if EROD activity is an appropriate tool to detect effects of contaminants. The EROD activity in the liver of 687 dabs, caught in the North Sea at different seasons in 1995 and 1996 with the fishery research vessel “Walther Herwig III”, has been determined and the data obtained have been statistically evaluated. The logarithmically transformed values of the EROD activity are following approximately a normal distribution. Due to the wide variation of the enzyme activities and due to the small number of samples minor differences between samples are not detectable. Nevertheless, comparing the enzyme activities at different sites of the North Sea, some significant differences have been identified. A model for the description of seasonal variations of EROD activity, developed at the Biologische Anstalt Helgoland, could be helpful for interpretation.

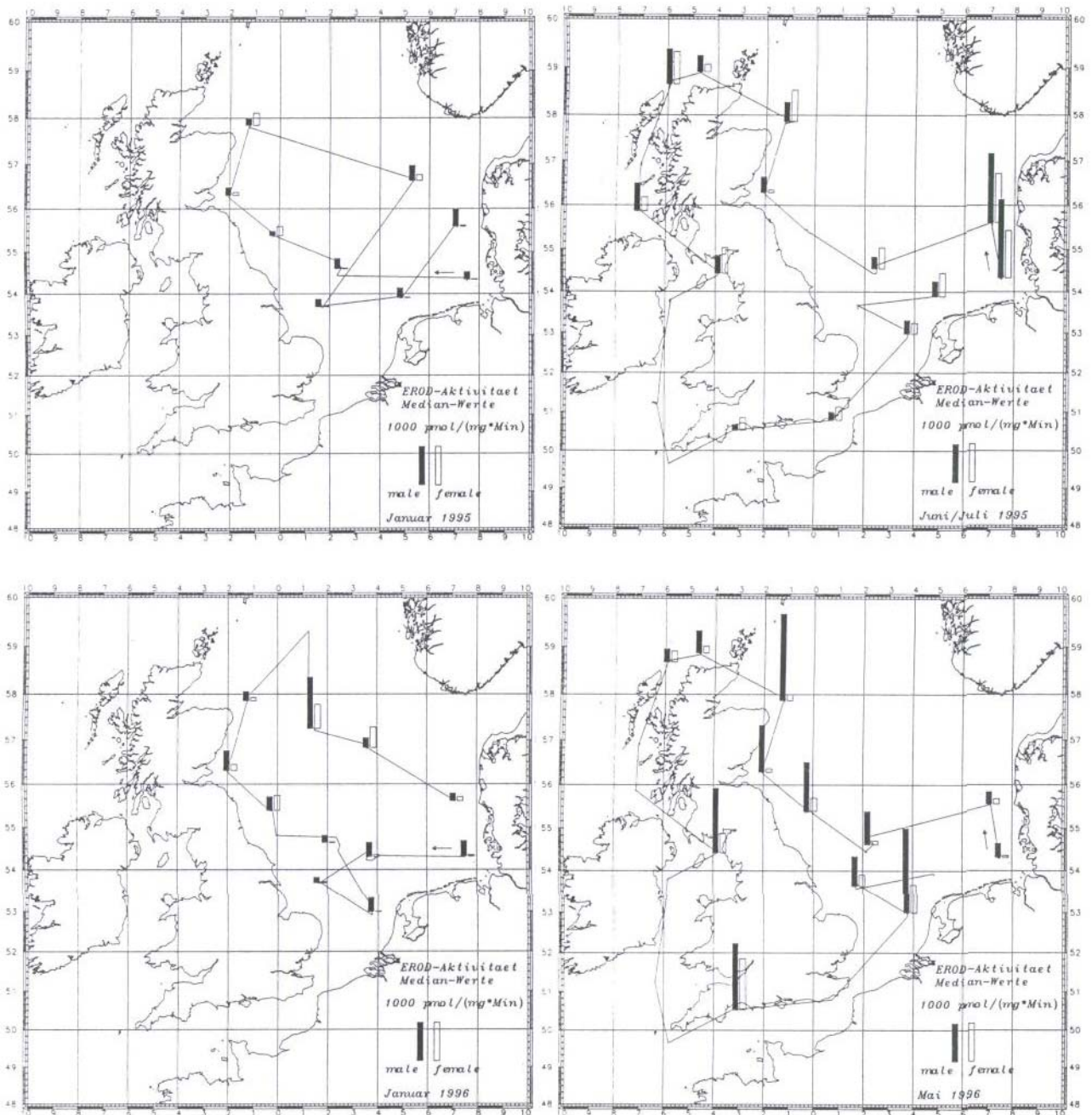


Abb.1: Regionale Mediane der EROD-Aktivität ($\text{pmol}/(\text{mg}\cdot\text{Min})$) in Klieschenlebern getrennt nach Geschlechtern für alle Probenahmen.

Regional median values of EROD activity ($\text{pmol}/(\text{mg}\cdot\text{Min})$) in liver of female and male dab (*Limanda limanda*) for all samplings.X

EROD-Aktivitäts Status von Nordsee-Klieschen zu erhalten, der als Basis für die weitere Probenahmestrategie dienen sollte. Dazu wurden in jedem Gebiet aus verschiedenen Fängen jeweils etwa 10 männliche und 10 weibliche Klieschen mittlerer Größe (20 - 25 cm lang) entnommen. Fische, die äußerlich erkennbar erkrankt waren, wurden nicht berücksichtigt.

Die Aufarbeitung der Leberproben erfolgte in Anlehnung an die Methode von Pluta (Pluta 1991): Sofort

nach Tötung der frisch gefangenen Klieschen wurde die Leber entnommen und ein Teil davon in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die mikrosomale Fraktion wurde durch differentielle Zentrifugation (10 000 g, 100 000 g; 1 g = Erdbeschleunigung) gewonnen. Die EROD-Aktivitätsmessungen erfolgten durch fluoreszenzspektrophotometrische Messungen des gebildeten Enzymproduktes, des Resorufins. Die Aktivität wird in Picomol gebildetes Resorufin pro Minute pro Milligramm mikrosomales Protein ($\text{pmol}/(\text{mg}\cdot\text{Min})$) angegeben.

Alle Werte der EROD-Aktivität, die kleiner waren als das Dreifache ihres Standardfehlers, wurden, wie auch bei anderen Untersuchungen üblich, als „kleiner Nachweisgrenze“ (NG) klassifiziert. Das bedeutet, daß der richtige Zahlenwert unerkennbar irgendwo zwischen Null und der Nachweisgrenze liegt. Die aus dieser Vorgehensweise resultierende Nachweisgrenze für die EROD-Aktivität lag bei etwa 10 pmol/(mg·Min). Von insgesamt 687 Meßwerten fielen 46 in diese Klasse. Das ist ein Anteil von rund 7 Prozent. Für die Behandlung solcher „NG-Werte“ in der Datenanalyse gibt es, je nach Fragestellung, verschiedene Strategien. Hier wurden überwiegend ihre zahlenmäßig ermittelten Werte verwendet.

Die statistischen Auswertungen der EROD-Aktivitäten (Lageparameter, Varianzanalysen) erfolgten mit dem Programmsystem SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Weil darin keine spezielle Statistik für kleiner „NG“-Werte vorgesehen ist, wurden alle Werte, die deutlich unterhalb der Nachweisgrenze lagen (hier: 1 pmol/(mg·Min)), als „missing values“ benannt, alle übrigen zahlenmäßig verwendet. Diese Vorgehensweise dürfte wegen der hier wenigen betroffenen Werte (insgesamt 12 Stück von 687) keine drastische Auswirkung auf die Ergebnisse haben. Bei analytischen Werten von Schadstoffen in Biota wird häufig eine asymmetrische Verteilung vorgefunden. Selbst bei gleichartiger Exposition der Tiere sind die Werte größtenteils so verteilt, daß eine Normalverteilung nur dann eine passende Beschreibung liefert, wenn nicht die Werte selbst, sondern ihre Logarithmen verwendet werden. Wegen der annähernd „lognormalen“ Verteilungen der EROD-Aktivitäten wurde die Statistik mit den logarithmierten Werten durchgeführt.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt, getrennt für männliche und weibliche Tiere, die Mediane der EROD-Aktivitäten in allen beprobten Gebieten. Behandelt werden in diesem Bericht aber lediglich solche Gebiete, die in der Nordsee liegen. Für eine erste Sichtung wurden die Daten der EROD-Aktivität zunächst zusammengefaßt. Ein isolierter sehr hoher Wert von 9530 pmol/(mg·Min) wird als Ausreißer angesehen, weil er für ein weibliches Tier einer Winterreise (Januar 1996) ermittelt wurde und nahezu doppelt so hoch wie alle anderen Werte ist. Die danach größten Werte all dieser EROD-Aktivitäten liegen deutlich näher zusammen, es sind: 5820, 5370, 4900

und 4280 pmol/(mg·Min). Der Median liegt bei 260 pmol/(mg·Min). Mit diesen EROD-Aktivitäten wird ein breiter Wertebereich abgedeckt. Dabei überwiegen die kleineren Werte (1. Quartil: 79 pmol/(mg·Min), 3. Quartil: 713 pmol/(mg·Min)). Diese asymmetrische Verteilung der Werte bleibt auch dann bestehen, wenn die Daten differenzierter, z.B. nach Geschlecht und Jahreszeit selektiert, analysiert werden. Das Ergebnis kann der Tabelle 1 entnommen werden.

Geschlechtsabhängige Unterschiede sind nach Varianzanalysen bis auf wenige Ausnahmen nicht zufällig (95 % Konfidenzintervall). Überwiegend sind in unseren Datensätzen die EROD-Aktivitäten männlicher Tiere stochastisch größer als solche zugehöriger weiblicher Tiere. Nach diesen Kenntnissen wurden zum Mindern der Varianz und damit einhergehend zum Schärfen der Aussage, die Daten nach Geschlechtern getrennt ausgewertet.

Tab. 1: Statistische Kenngrößen der EROD-Aktivitäten in Klieschenlebern (pmol/(mg·Min))

Reise	Jahreszeit	Sex	Anzahl	1.Quartil	Median	3.Quartil
155.	Jan.'95	F	86	9	43	167
155.	Jan.'95	M	89	116	229	424
161.	Jun/Jul'95	F	70	214	552	1070
161.	Jun/Jul'95	M	70	276	675	1860
167.	Jan.'96	F	109	16	91	276
167.	Jan.'96	M	102	134	276	548
172.	Mai '96	F	80	50	154	544
172.	Mai '96	M	80	461	864	1750

Dabei zeigt sich, daß die mittlere Höhe der EROD-Aktivitäten zu verschiedenen Jahreszeiten unterschiedlich ist. Allerdings geht in den einzelnen Gebieten der Unterschied zwischen Sommer- und Winterreisen nicht in eine Richtung. Lediglich die jahreszeitlich späteste Reise im Juni/Julii 1995 präsentiert durchweg hohe EROD-Aktivitäten. Die Werte der Reise im Frühsommer (Mai 1996) lassen sich in verschiedenen Gebieten manchmal besser den Winterdaten, manchmal besser den Sommerdaten zuordnen. Dabei kann diese Zuordnung auch noch unterschiedlich vom Geschlecht beeinflußt werden. In dieser Aussagevielfalt spiegelt sich sehr deutlich die Problematik der Bewertung von EROD-Aktivitäten. Es darf offensichtlich nicht einfach aus dem Vergleich verschiedener unabhängig voneinander bestimmter EROD-Aktivitäten auf die Belastungssituation ihrer Ökosysteme rückgeschlossen werden.

In diesem Zusammenhang sollten saisonale Einflüsse im Lebensrhythmus der Fische bedacht werden. Fische sind mit ihren Lebensvorgängen besonders eng an die Wassertemperatur gekoppelt. Beim Werdegang ist aber

nicht nur die momentane Temperatur, sondern auch ihr früherer Verlauf wichtig. Die Nordsee mit ihrer zirkulierenden Strömung und ihrem relativ raschen Wasseraustausch prägt verschiedenen Arbeitsgebieten deutlich verschiedene Temperaturgänge auf. Eine Auswirkung davon ist beispielsweise in dem regional zeitlich verschobenen Laichzeitpunkt erkennbar.

Nach einer an der Biologischen Anstalt Helgoland entwickelten Modellvorstellung (Lange 1995) ist ebenso die EROD-Aktivität einem saisonalen Zyklus unterworfen. Selbst in unbelasteter Umgebung steigt im Frühsommer die EROD-Aktivität von relativ niedrigen Werten für die Dauer von etwa sechs Wochen stark an, um danach wieder auf niedrige Herbst-/Winterwerte abzufallen. In diesem Modell sind die EROD-Aktivitäten für männliche und weibliche Klieschen im Maximum gleich hoch. Es besteht aber eine zeitliche Verschiebung derart, daß männliche Tiere die hohen Werte früher zeigen als weibliche. Dieser saisonale Gang wird von der Umgebungstemperatur beeinflusst. In Gebieten mit durchweg höheren Temperaturen zeigt sich bei beiden Geschlechtern das Maximum früher im Jahr. Dieses wird im Modell dadurch berücksichtigt, daß nicht die Jahreszeit, sondern das Temperaturintegral über die Zeit (Monatsgrade) als unabhängiger Parameter eingeht. Sein Wert wird in Anlehnung an den biologischen Jahresrhythmus von Fischen für den 1. September willkürlich auf Null gesetzt (Abbildung 2, Kurvenverlauf).

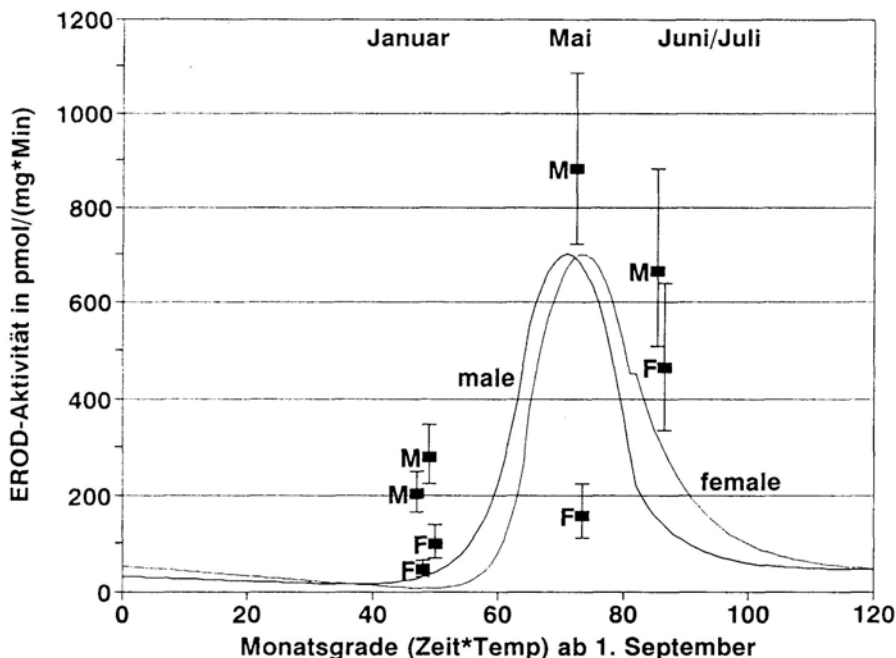


Abb.2: Vergleich von gemessenen EROD-Aktivitäten und 95%-Konfidenzintervallen aus Lognormverteilungen in Lebern von Klieschen (F=weiblich, M=männlich) der Nordsee zu verschiedenen Jahreszeiten (Monatsgrade) mit dem saisonalen Modell (Lange 1995).

Comparison of EROD activity data and 95%-confidence interval from lognormal distribution in liver of dab (F=female, M=male) from the North Sea during different seasons (month degrees) with the seasonal model (Lange 1995)

Wir haben versucht mit unseren Daten das Modell zu testen. Für die einzelnen Gebiete liegen zu wenig Daten vor, um mit ihnen bei der vorgefundenen Streuung die Modellaussagen verifizieren zu können. Daher haben wir unser Datenmaterial folgendermaßen zusammengefaßt: Aus veröffentlichten monatlichen mittleren Bodentemperaturen, gemittelt über Jahrzehnte, in verschiedenen Gebieten (Tomczak 1962), wurde durch Mittelung nur über unsere Untersuchungsgebiete der Temperaturgang der „Nordsee“ abgeleitet. In gleicher Weise wurden die gemessenen EROD-Aktivitäten der Gebiete, nach Geschlechtern und Jahreszeiten getrennt, zu „Nordsee“-Werten vereint und in Abbildung 2 dargestellt. Diese Abbildung enthält also neben der Kurve für die zitierte Modellvorstellung des EROD-Aktivitätsverlaufs statistische Kenngrößen der von uns gemessenen EROD-Aktivitäten an den entsprechenden Monatsgraden.

Prinzipiell finden wir eine Beschreibung unserer Ergebnisse durch das Modell. Ein vorausgesagter Anstieg der EROD-Aktivitäten im Frühsommer ist ebenfalls gemessen worden. Jedoch sind auch Abweichungen zu obiger Modellvorstellung erkennbar. Offenbar haben im Maximum die männlichen Tiere höhere Werte als die weiblichen. Diese Aussage ist wegen der wenigen Datenpunkte nicht stark belastbar, sollte aber dennoch beachtet werden. Es ist auch nicht auszuschließen, daß die relativ niedrigen Wassertemperaturen im Frühsommer 1996 Ursache für die bei weiblichen Tieren gefundenen niedrigen EROD-Werte sind.

Die bei weiblichen Tieren gefundenen niedrigen EROD-Werte sind.

Schlußfolgerung

Der Jahresgang der EROD-Aktivität in der Leber ist, wie aus dieser Gegenüberstellung von Modell und Daten sichtbar geworden, für die Interpretation von gemessenen Werten von zentraler Bedeutung. Es ist daher geplant, ihn für Klieschen der Nordsee gründlicher zu untersuchen. Im Jahre 1997 sollen in der Deutschen Bucht etwa monatlich Proben von jeweils 20 Tieren jeden Geschlechts genommen werden, um diesen Jahresgang deutlicher analysieren zu können. Ein mit diesen Ergeb-

nissen verfeinertes Modell könnte den natürlichen Verlauf der EROD-Aktivität möglicherweise besser beschreiben. Damit hätte man eine genauere Unterscheidungsmöglichkeit zwischen saisonaler und schadstoffbedingter EROD-Aktivität zur Verfügung. Darauf aufbauend sollte eine mögliche Schadstoffbelastung des Ökosystems durch Messen der EROD-Aktivität sicherer erkannt werden.

Literatur

Lange, U., Saborowski, R., Karbe, L., Siebers, D.: A Model for the Prediction of the Basal EROD-Activity Levels. ICES C.M. (E7), 1995.

Pluta, H.-J.: Untersuchungen zur Biotransformation ("Entgiftungsaktivität" der Mischfunktionellen Oxidasen, MFO) in der Leber. Abschlußbericht des Teilvorhabens 3 zum FuE-Vorhaben "Fischkrankheiten im Wattenmeer". Bundesgesundheitsamt, Berlin, Forschungsvorhaben BGA-Code.-Nr.: 1342 118, 1991.

Tomczak, G., Goedecke, E.: Monatskarten der Temperatur der Nordsee, dargestellt für verschiedene Tiefenhorizonte. Ergänzungsheft Reihe B (4°), Nr.7 zur Deutschen Hydrographischen Zeitschrift, 1962.