

Funktionen von Makrophagen und ihren Aggregaten als  
histochemische Biomarker für Immunmodulation in Fischen  
verschiedener Klimazonen

Von dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

Dipl. Biol. Katja Broeg  
Geboren am 15.12.1962 in Hamburg

2002

Referent: Prof. Dr. D. Steinhagen  
Korreferent: Prof. Dr. D. Siebers

Tag der Promotion: 17.12.2002

Meinen Eltern gewidmet, in Liebe und Dankbarkeit.

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN.....	7
<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
GRUNDLEGENDE GEDANKEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....	9
MAKROPHAGEN UND IHRE AGGREGATE IN FISCHEN.....	14
DIE MORPHOLOGIE VON MAKROPHAGEN AGGREGATEN DER PLATTFISCHLEBER.....	15
UNTERSUCHTE SCHLÜSSELFUNKTIONEN IN MAKROPHAGEN UND MAKROPHAGEN AGGREGATEN .....	17
<i>Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) E.C. 1.1.1.49</i> .....	19
<i>Phosphogluconat Dehydrogenase (PGDH) E.C. 1.1.1.44</i> .....	20
<i>Saure Phosphatase (SP) E.C. 3.1.3.2</i> .....	20
<i>Nitritoxid Synthase (NOS) EC 1.14.13.39</i> .....	20
<i>Aldehyd Dehydrogenase (ALDH) E.C. 1.2.1.3</i> .....	21
UNTERSUCHTE FISCHARTEN .....	22
BESCHREIBUNG DER UNTERSUCHTEN MEERESGEBIETE .....	24
<i>Nordsee</i> .....	24
<i>Mittelmeer und Rotes Meer (Golf von Aquaba)</i> .....	24
AUFBAU DER ARBEIT .....	27
<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
PROBENNAHMEN.....	28
<i>Nordsee</i> .....	28
<i>Mittelmeer</i> .....	28
<i>Rotes Meer</i> .....	28
<i>Präparation</i> .....	29
<i>Probenahme für Enzymhistochemie</i> .....	29
<i>Probenahme für Histopathologie</i> .....	29
<i>EROD</i> .....	30
<i>Kopfnierenprimärzellkulturen</i> .....	30
PROBENAUFARBEITUNG.....	31
<i>Enzymhistochemie</i> .....	31
<i>Histopathologie</i> .....	32
HISTOCHEMISCHE METHODEN .....	33
<i>Histochemische Methoden an Gefrierschnitten</i> .....	33
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (Van Noorden und Fredericks, 1992).....	34
Phosphoglyconat-Dehydrogenase (PGDH) (Van Noorden und Fredericks, 1992).....	34
Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) (Van Noorden und Fredericks, 1992) .....	35
Nitrit-Oxid-Synthase (NOS) .....	35
Saure Phosphatase (SP).....	36
Die lysosomale Labilisierungszeit.....	36
Die Aktivität der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten .....	38
<i>Histochemische Methoden an lebenden Kopfnierenzellen</i> .....	38
DiffQuick Färbung.....	38
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH).....	39
Phospho-Glyconat-Dehydrogenase (PGDH) .....	39
Saure Phosphatase (SP).....	40
DT-Diaphorase/NOS.....	40
Nachweis von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS).....	40
Aldehyd Dehydrogenase (Benzaldehyd als Substrat) .....	41
<i>Histochemische Methoden an Methacrylatschnitten</i> .....	41
Die Hämatoxylin und Eosin Färbung (H&E).....	41
Die Färbung für Polkapseln von Myxosporidien-Sporen (Ziehl -Neelsen- Methode) .....	42
Die PAS - Färbung (Perjodsäure - Schiff - Reaktion) .....	43
EROD.....	44
LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	44
BESTIMMUNG DER LYSOSOMALEN LABILISATIONSZEIT (LL).....	45
HISTOPATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN-DIAGNOSTIK DER PARASITENINFEKTION .....	45
SCHADSTOFFANALYTIK .....	45
STATISTIK .....	46

<b>KAPITEL 1.....</b>	<b>47</b>
FUNKTIONSANALYSEN AN LEBENDEN MAKROPHAGEN AUS DER KOPFNIERE VON MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN FLUNDERN AUS UNTERSCHIEDLICH STARK BELASTETEN GEBIETEN DER DEUTSCHEN BUCHT .....	47
<i>Einleitung</i> .....	47
<i>Material und Methoden</i> .....	48
Stimulierung und histochemische Enzymreaktionen .....	48
Auswertung .....	48
<i>Ergebnisse</i> .....	49
Generelle Belastungssituation .....	49
Zellgröße .....	51
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) .....	52
Phosphogluconat Dehydrogenase (PGDH) .....	52
Saure Phosphatase (SP).....	53
Aldehyd Dehydrogenase mit Benzaldehyd als Substrat (ALDHbenz).....	54
DT-Diaphorase/ iNOS und reaktive Sauerstoffmetabolite (ROS).....	55
<i>Schlussfolgerung</i> .....	58
<b>KAPITEL 2.....</b>	<b>59</b>
SALINITÄTSEXPERIMENT.....	59
<i>Einleitung</i> .....	59
<i>Material und Methoden</i> .....	60
Fische und Hälterung .....	60
Experiment .....	60
Entnahmeprotokoll.....	61
Präparation .....	61
Methoden .....	61
<i>Ergebnisse</i> .....	62
<i>Schlussfolgerung</i> .....	64
<b>KAPITEL 3.....</b>	<b>65</b>
FUNKTIONEN DER MAKROPHAGEN AGGREGATE ALS MARKER FÜR IMMUNMODULATION IM INTEGRIERTEN BIOLOGISCHEN EFFEKTMONITORING- NORDSEE .....	65
<i>Einleitung</i> .....	65
<i>Ergebnisse</i> .....	67
<i>Größe und Enzymaktivität der Sauren Phosphatase (SP) in Makrophagen Aggregaten</i> .....	67
<i>-Natürliche Variabilität-</i> .....	67
Abhängigkeit der MA-SP und -Größe vom Geschlecht und der Laichreife der untersuchten Flundern... 67	
Abhängigkeit der MA-SP und -Größe von der Länge der untersuchten Flundern.....	69
Abhängigkeit der MA-SP und -Größe von saisonalen Schwankungen.....	70
<i>Schadstoffeffekte</i> .....	74
Rückstandsanalytik in der Leber .....	74
Rückstandsanalytik im Muskel .....	77
Schadstoffbelastung im Muskelgewebe von weiblichen und männlichen Flundern .....	81
<i>Schlussfolgerung</i> .....	83
INTEGRIERTE AUSWERTUNG DER DATEN.....	84
<i>Die k-means Analyse (Schmolke et al., 1999)</i> .....	85
<i>Einstufung von Schädigungsgraden</i> .....	88
<i>Der „Health-Assessment-Index“ (HAI)</i> .....	92
<b>KAPITEL 4.....</b>	<b>94</b>
FUNKTIONEN DER MAKROPHAGEN AGGREGATE ALS MARKER FÜR IMMUNMODULATION IM INTEGRIERTEN BIOLOGISCHEN EFFEKTMONITORING -MITTELMEER UND ROTES MEER .....	94
<i>Charakterisierung der untersuchten Stationen</i> .....	94
Mittelmeer.....	94
Rotes Meer.....	97
<i>Einfluss der Schadstoff-Belastungssituation auf immunologische und physiologische Parameter</i> .....	100
<i>Organochlorverbindungen</i> .....	100
<i>Kupfer</i> .....	108
<i>Schlussfolgerung</i> .....	111

<b>KAPITEL 5.....</b>	<b>114</b>
EINFLUß VON PARASITENINFEKTIONEN DER LEBER AUF DIE UNTERSUCHTEN MA-PARAMETER UND - BIOMARKER IN <i>LIZA AURATA</i> VON ZWEI UNTERSCHIEDLICH BELASTETEN STATIONEN DER ISRAELISCHEN MITTELMEERKÜSTE .....	114
<i>Einleitung</i> .....	114
Einzellige Fischparasiten .....	114
Myxosporidien .....	115
<i>Ergebnisse</i> .....	116
Diagnostik und Histopathologie.....	116
Bildung von Plasmodien und Reaktion des Immunsystems.....	117
Histopathologie des Lebergewebes von <i>Liza aurata</i> unterteilt nach Belastungsgruppen (PCB153) und Infektionsklassen.....	122
Besiedelung der Galle mit Myxosporidien und Infektionsklassen in der Leber. Vergleich mit Ergebnissen anderer Kollegen am gleichen Fischindividuum .....	123
Geschlechtsabhängige Unterschiede in der Parasiteninfektion und MA-SP Aktivität .....	126
<i>Schlussfolgerung</i> .....	130
<b>KAPITEL 6.....</b>	<b>133</b>
BELASTUNG UND PARASITENINFEKTION- IST EINE NUTZUNG DER MAKROPHAGENPARAMETER ALS BIOMARKER FÜR ANTHROPOGENE BELASTUNG UNTER DIESEN UMSTÄNDEN MÖGLICH? .....	133
<i>Vergleich zwischen nicht infizierten Meeräschen der belasteten und der gering belasteten Station</i> .....	133
<i>Vergleich zwischen infizierten Meeräschen (Infektionsklasse 1) der belasteten und der gering belasteten     Station</i> .....	140
<i>Vergleich zwischen infizierten Meeräschen (Infektionsklasse 2, Zystenstadium) der belasteten und der     unbelasteten Station</i> .....	144
<i>Vergleich zwischen infizierten und nicht infizierten Meeräschen auf den jeweiligen Stationen</i> .....	146
<i>Schlussfolgerung</i> .....	163
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>165</b>
UNTERSUCHUNGEN AN ISOLIERTEN MAKROPHAGEN DER KOPFNIERE .....	166
SAURE PHOSPHATASE AKTIVITÄT UND GRÖßE VON MAKROPHAGEN AGGREGATEN DER LEBER- NATÜRLICHE VARIABILITÄT .....	171
<i>Salinität</i> .....	171
<i>Temperatur</i> .....	171
<i>Geschlechtsspezifische Variabilität</i> .....	172
SAURE PHOSPHATASE AKTIVITÄT UND GRÖßE VON MAKROPHAGEN AGGREGATEN DER LEBER- SCHADSTOFFEFFEKTE .....	173
<i>Organochlorverbindungen</i> .....	173
<i>Schwermetalle</i> .....	178
NOS-HEMMUNG.....	180
SAURE PHOSPHATASE HEMMUNG.....	181
MA-SP AKTIVITÄT IM INTEGRIERTEN MONITORING .....	183
PARASITEN.....	184
MAKROPHAGENAGGREGATE UND PHYLOGENESE .....	187
SCHLUSSFOLGERUNG.....	189
<b>LITERATUR.....</b>	<b>190</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>208</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>210</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>212</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>213</b>

## Abkürzungen

AhR	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
ALDH	Aldehyd Dehydrogenase
ALDHbenz	ALDH mit Benzaldehyd als Substrat
ARGE Elbe	Wassergütestelle Elbe
AWI	Alfred-Wegener-Institut
BAH	Biologische Anstalt Helgoland
BEQUALM	Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes
β-NF	Beta Naphthoflavon
ca.	zirka
Cd	Cadmium
CKW	Clorierte Kohlenwasserstoffe
Cu	Kupfer
CYP450	Cytochrom P 450
CYP1A1	EROD
DDD	Dichlor-Diphenyl-Dichlorethan
DDE	Dichlor-Diphenyl-Ethan
DDT	Dichlor-Diphenyl-Trichlorethan
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EROD	Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Deethylase
EU	Europäische Union
FAD	Flavin Adenin Dinucleotid
Fe	Eisen
FMN	Flavin Mononucleotid
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>4</sub> B	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-Biopterin
HAI	Health Assessment Index
HCB	Hexachlorbenzol
HCH	Hexachlor Cyclohexan
H&E	Hämatoxylin und Eosin
Hg	Quecksilber
ICES	International Council for the Exploration of the Seas
LL	Lysosomale Labilisationszeit
L-NMMA	N <sup>G</sup> -Methyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharide
LSI	Lebersomatischer Index
LYS 1,2	Lysosomale Membranstabilität 1 und 2
m	männlich
MD	Missing Data
MA	Makrophagen Aggregate
MA-SP	Saure Phosphatase in Makrophagenaggregaten
Mφ	Einzelmakrophagen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min.	Minute
Mn	Mangan
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat (reduziert)
NBT	Nitroblau Tetrazolium
NOS	Nitrit Oxid Synthase
eNOS	endotheliale NOS
iNOS	induzierbare NOS
nNOS	neuronale NOS
ns	nicht stimuliert
PL	Plasmodium

PAK	Polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
Pb	Blei
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PG	Phosphogluconsäure
PGDH	Phosphogluconat Dehydrogenase
Pk	Polkapsel
PMA	Phorbol Myristat Acetat
Prot.	Protein
$O_2^-$	Superoxid-Anion
OCS	Octachlorstyrol
OSPAR	Oslo Paris Kommission
RES	Retikuloendotheliales System
RNI	Reaktive Stickstoffintermediate
RNOI	Peroxynitrit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	stimuliert
SOD	Superoxid Dismutase
SP	Saure Phosphatase
TBT	Tibutylzinn
TR	Tiefe Rinne
w	weiblich
Zn	Zink



# Einleitung

## Grundlegende Gedanken der vorliegenden Arbeit

Gesundheitsschädigungen mariner Vertebraten aufgrund der Belastung ihres Lebensraumes mit anthropogenen Schadstoffen und ihre Nutzung als prediktive Marker für Umweltveränderungen sind in den letzten 15 Jahren in den Mittelpunkt des allgemeinen Interesses gerückt (Myers et al., 1987, Andersson et al., 1988, Köhler 1989, 1991, Murchelano und Wolke, 1991, Köhler et al., 1992, Vethaak und Rheinallt, 1992, Broeg et al., 1999). Eine nicht mehr zu übersehende Menge und Vielfalt verschiedener Chemikalien, deren toxische Wirkungen alleine und vor allem in ihrer Kombination nicht bekannt sind, belasten vor allem die marine Umwelt im Küstenbereich aller Welt- und Randmeere.

Mehr als 30.000 verschiedene Chemikalien werden pro Jahr in der EU in einem Umfang von mehr als einer Tonne produziert, mehr als 90% davon sind nicht auf ihre Toxizität getestet, da es sich um sogenannte „Altstoffe“ handelt, die vor der Chemikalienverordnung 1981 zugelassen worden sind. Viele Abbauprodukte (Metabolite) dieser Chemikalien sind in ihrer Struktur weder chemisch aufgeklärt, noch sind ihre möglichen Effekte auf Umwelt und Mensch bekannt. Mittlerweile gibt es deutliche Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit, einem verstärkten Auftreten von bakteriellen und viralen Infektionen, sowie einer erhöhten Tumorraten in Fischen und der anthropogenen Belastung ihres Lebensraumes besteht (Grinwis et al., 1998, Vethaak und Jol, 1996, Vethaak, 1993, Köhler, eingereicht, Malins et al., 1984). Besonders im Küstenbereich steht der Mensch in engem Kontakt mit der aquatischen Umwelt, sei es als Konsument von Fisch und Meeresfrüchten oder als Tourist in diesen Regionen. Zahlreiche Studien, zum Beispiel über die Anreicherung von Schadstoffen durch den Verzehr von Fisch (Lommel et al., 1985) belegen, dass dieser Kontakt für den Menschen durchaus negative Folgen haben kann und dass Schadstoffeffekte somit nicht an der Wasserlinie halt machen. Diese Entwicklung führte zu ernsthaften Überlegungen, eine nachhaltige Nutzung der Küsten- und Meeresgebiete in den Vordergrund politischen Handelns zu stellen und Flüsse nicht mehr ohne weiteres alleine als Vorfluter zu nutzen, wie es zwischen den 50er und 80er Jahren die Regel war. Zahlreiche internationale und nationale Gremien wurden gegründet und befassen sich seitdem mit der Strukturierung und Entwicklung von Strategien, um den Stand der marinen Umweltbelastung zu überwachen und die Kontaminationssituation generell zu verbessern (Stagg 1998, Tab. 1).

Der Wille nach Veränderung in diesem Bereich setzte die Entwicklung von Tests voraus, die in der Lage sind, Effekte von Chemikalien auf marine Organismen deutlich und zuverlässig zu reflektieren. Diese Tests sollen auf der einen Seite als Frühwarnsysteme dienen, mit denen Alarm gegeben werden kann, bevor tote Fische auf der Wasseroberfläche treiben, Bilder, die uns allen noch vor Augen sind und die in der Vergangenheit durchaus keine Seltenheit waren. Auf der anderen Seite ist es entscheidend zu wissen, wie weit die Schädigung des biologischen Systems durch chronische Belastung fortgeschritten ist.

Tabelle 1: Politische Entwicklungen und Kommissionen für den Schutz der Meere: Nordsee, Nordostatlantik und Mittelmeer. Nach Köhler 2002.

*Nordsee und Nordatlantik*

- 1972 London Dumping Konvention
- 1973 MARPOL, internationale Konvention zur Vermeidung von Meeresverschmutzung durch Schiffe.
- 1974 Oslo Konvention für den Nordatlantik gegen Verschmutzung durch Schiffe und Flugzeuge.
- 1974 Paris Konvention- Verschmutzung von Land.
- 1978 Joint Monitoring Programm (JMP). ICES Beirat der Regierungen und Arbeitsgruppen.
- 1989 Das Vorsorgeprinzip wird durch die Paris Kommission generell akzeptiert.
- 1992 Fusion der Oslo und Paris Kommission (OSPAR), Definition der Ziele.
- 1995 Definition der „Prinzipien der Vorsorge, Verantwortlichkeit und Kooperation“.

*Mittelmeer*

- 1975 Barcelona: Verabschiedung des Mittelmeer Aktionsplanes (MAP)
- 1976 Konvention über Dumping und Notfallmaßnahmen.
- 1978-1995 12 Konventionen und Abkommen werden formuliert.
- 1995 MAP Phase II: Protokoll über spezielle geschützte Gebiete und biologische Diversität. Überarbeitung des Dumping Protokolls.
- 1997 MAP: Beteiligung am Konzept der nachhaltigen Entwicklung im Mittelmeer, Athen.
- 1997 UNEP: MAP und Konvention für den Schutz der Marinen Umwelt und der Küstenregionen des Mittelmeeres, Athen.
- 1999 UNEP: Strategisches Aktionsprogramm zur Verschmutzung durch Aktivitäten an Land, Athen.
- 1999 UNEP/RAMOGÉ Kommission: Handbuch der Biomarker, vorgeschlagen für das MED POL Biomonitoring Programm, Athen.

Frühe Effekte, auf molekularer, subzellulärer oder zellulärer Ebene, die sich aufgrund von Umweltbelastungen in Fischen manifestieren, können wichtige Hinweise darauf geben, in welchem Maße die marine Umwelt gestört ist und haben aus diesem Grunde „Beweiskraft“ für den Schädigungsgrad toxischer Substanzen. Viele Mechanismen, die im Rahmen von sogenannten Effektmonitoring-Studien als Biomarker untersucht werden, reagieren nicht nur im Fisch, sondern ebenfalls in Säugetieren auf Schadstoffeinfluss. So zum Beispiel die Induktion des Cytochrom P 450 Biotransformationssystems, verursacht durch Polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), Dioxine und coplanare PCBs. Diese lipophilen Schadstoffe werden im Verlauf der Metabolisierung in der Leber durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse in zum Teil noch wesentlich toxischere, radikale Metabolite wie zum Beispiel Epoxide umgewandelt, um in einem weiteren Schritt ihre Eliminierung aus dem Organismus zu ermöglichen (Achazi, 1989, Khan et al., 1979, Parke, 1987, Goepfert, 1995). Ein weiteres Beispiel für einen Biomarker, der im Fisch aber ebenso auch in Säugetieren angewendet werden kann, ist die Stabilität lysosomaler Membranen in Hepatozyten (zusammengefasst in Köhler, 2002, Bitensky, 1973). Dieser Test, der ein sensitiver Parameter für die Messung von

toxipathischen Leberzellschädigungen ist, wurde ursprünglich sogar in Säugetieren entwickelt und dann erst auf die Anwendung als Biomarker in Invertebraten und schließlich in Fischen übertragen (Köhler, 1991). Eine Vielzahl der Tests, die im Rahmen von nationalen und internationalen Projekten und Überwachungsprogrammen geprüft und zum Teil bereits angewendet wird, wird am Lebergewebe oder der Mitteldarmdrüse der jeweiligen Indikator-Organismen durchgeführt.

Die Leber spielt bei Untersuchungen von Schadstoffwirkungen eine zentrale Rolle, da sie durch die Aktivität des Biotransformationssystems als Entgiftungsorgan fungiert, und dadurch die Umwandlung lipophiler Schadstoffe und deren Ausscheidung aus dem Organismus ermöglicht. Außerdem stellt sie ein wichtiges Stoffwechselorgan dar, dessen Funktionsfähigkeit für den gesamten Organismus, ebenso wie für die Fortpflanzungsfähigkeit von Fischen von außerordentlicher Wichtigkeit ist. Die Aufnahme von Schadstoffen aus den zuführenden Blutgefäßen in die Leberzelle erfolgt über Endozytose. Schadstoffe akkumulieren in der Leber und entfalten dort ihre toxische Wirkung. Die Schadstoffwirkung und die daraus folgenden Effekte sind daher in diesem Organ besonders ausgeprägt, wie auch nachgewiesen für die Wirkung von Xenobiotika in Säugetieren. Aus diesem Grund wird die Leber als zentrales Organ für die Untersuchung von Schadstoffeffekten in Vertebraten genutzt. Ein breites Spektrum an Biomarkern wird im Gewebe der Leber gemessen (Tab. 2).

Während die oben genannten biochemischen und histochemischen Marker bereits in hohem Maße gestestet und in Routinemonitoringverfahren angewendet werden, gibt es nur sehr unzureichende Informationen über die Reaktion des unspezifischen Immunsystems in der Leber von Fischen auf Schadstoffeinfluss. Zellen des Immunsystems stehen, genau wie die anderen Zelltypen in der Leber, im Zentrum der Schadstoffwirkung und eine Reaktion der Immunabwehr auf diese Schadstoffwirkung erscheint daher wahrscheinlich. Die Schwierigkeit der Entwicklung eines Tests der die Immunkompetenz erfassen kann liegt in der Tatsache, dass es nur einzelne Zellen und Zellgruppen sind, die die Immunabwehr in der Leber bilden. Es musste also ein Verfahren entwickelt werden, mit dessen Einsatz es möglich ist, die Aktivität einzelner Zellen und Zellgruppen innerhalb der Leber zu messen. Biochemische Arbeiten, die in der Regel durchgeführt werden (EROD, Acetylcholinesterase, Metallothionein) um Enzymaktivitäten und Proteingehalte zu messen, basieren auf der Homogenisierung des Gewebes. Mit diesen Methoden werden die Enzymaktivitäten aller Zellen, die sich zur Jetztzeit im jeweiligen Organ befanden, gemessen. Diese Methodik ist für Untersuchungen des innatens Immunsystems in der Leber nicht geeignet. Einzig histochemische Ansätze, die die Möglichkeit einer Kombination von Messungen der Enzymaktivität und Lokalisation der Enzymreaktion bieten, kommen für diese Art von Untersuchungen in Betracht. Auf dieser Technik beruhen bereits einige Biomarker: Lysosomenmembranstabilität, Apoptose, Akkumulation von Neutrallipiden, sowie die Erkennung früher neoplastischer Gewebsveränderungen in der Leber.

Fische sind aus verschiedenen Gründen ideale Modelle für die ökotoxikologische Risikoabschätzung (risk assessment) immunmodulatorischer Effekte. Ihr Immunsystem weist zum Einen viele Ähnlichkeiten mit dem Säugetiersystem auf und kann daher als Indikator für potentielle Schäden an höheren Vertebraten und dem Menschen dienen (Anderson und Zeeman, 1995, Zelikoff et al., 1991, Luebke et al., 1997). Zum Zweiten sind Fische repräsentative Wasserorganismen und ihre Reaktion gibt Aufschluss über generelle Schadstoffwirkung im aquatischen Bereich. Zum Dritten sind sie ökonomisch wichtige Organismen und die negativen Folgen einer geschwächten Immunabwehr kann sich über eine Verringerung der Populationsdichte auch auf ökonomische Interessen auswirken.

Aufgrund der hohen Komplexität des Immunsystems der Fische- wie bei Säugetieren setzt es sich aus antigen-spezifischen und unspezifischen Reaktionen zusammen- gibt es viele Ansätze, Immunmodulation zu untersuchen (Weeks et al., 1989). Die meisten dieser Tests setzen die Funktionsfähigkeit der Immunzellen voraus, was bedeutet, dass die Zellen in Kultur genommen werden müssen bevor sie in die Tests eingesetzt werden können. Dies gilt vor allen Dingen für Untersuchungen der Phagozytoseaktivität, der Chemotaxis, aber auch anderer Funktionen, wie die Erzeugung von Sauerstoffradikalen durch den „respiratory burst“, oder die Freisetzung von Cytokinen (zusammengefasst von Dunier und Siwicki, 1993). Für die Durchführung dieser Untersuchungen werden die lebenden Immunzellen künstlich stimuliert, entweder mit löslichen Stimulanzien wie Phorbol Myristat Acetat (PMA), oder mit partikulären, wie zum Beispiel Zymosan, oder Lipopolysacchariden aus bakteriellen Zellmembranen (LPS). Für die praktische Anwendung in Monitoring-Programmen bedeutet dies, dass die Durchführbarkeit der Tests an Bord von Forschungsschiffen, oder sogar direkt am Strand nach einer Probennahme an ihre Grenzen gerät. Untersuchungen an lebenden Zellen sind arbeitsintensiv und erfordern ein hohes Maß an Laborkapazität, die direkt nach der Beprobung zur Verfügung stehen muss.

Generell gilt für Biomarker, dass sowohl die Kosten gering, als auch der Aufwand bei der Durchführung überschaubar und möglichst einfach sein sollte (McCarthy und Shugart, 1990, Huggett et al., 1992, den Besten, 1998) und dies natürlich in Verbindung mit einer hohen Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Für alle Biomarker, die bereits in Überwachungsprogrammen eingesetzt werden, wie zum Beispiel EROD, Lysosomen Membranstabilität, DNA - Schädigungen, Micronucleus Tests, Acetylcholinesterase - Hemmung, und andere Enzymaktivitäten, können Proben direkt entnommen werden, die dann in flüssigem Stickstoff, beziehungsweise auf anderem Wege fixiert in die jeweiligen Labors transportiert werden und dort bis zur Aufarbeitung gelagert werden können. Während diese Tests Marker darstellen für:

<i>Genotoxizität</i>	DNA-Addukte/Unwinding, Micronucleus (L,B, BC, HC)
<i>Neurotoxizität</i>	Acetylcholinesterase Hemmung (M, BC)
<i>Spezifische Toxische Exposition</i>	EROD (L, BC)
<i>Spezifische Toxische Reaktion</i>	Lipidakkumulation (L, HC)
<i>Generelle Toxische Reaktion</i>	Lysosomale Membranschädigungen (L, HC)
<i>Toxische Reaktion</i>	Histopathologie (L, HC)
<i>Endokrine Veränderungen</i>	Vitellogenin in männlichen Fischen (B, IC)
<i>Schwermetalleinfluss</i>	Metallothionein (L, BC)
<i>Unspezifische Reaktion</i>	Programmierter Zelltod (Apoptose) (L, HC)

Tabelle 2: Beispiele für Biomarker, die *in situ* durchgeführt werden können, (L) werden im Lebergewebe untersucht, (B) werden im Blut untersucht, (M) werden im Muskel untersucht, (BC) biochemisch, (HC) histochemisch, (IC) immunchemisch

gibt es keinen Test für die Überprüfung immunmodulatorischer Effekte *in situ*. Diese Lücke soll durch die vorliegende Arbeit, die sich auf die Reaktion von Makrophagen Aggregaten als Teil der innate Immunantwort in der Leber verschiedener Fischarten aus Nordsee, Mittelmeer und Rotem Meer auf Schadstoffeinfluss und Parasiteninfektion konzentriert, geschlossen werden. Zur Klärung möglicher Schlüssel-Funktionen, die in den Makrophagen Aggregaten als Marker fungieren können, wurden ebenfalls Voruntersuchungen an lebenden Einzelmakrophagen (M $\phi$ ) aus der Kopfniere von Flundern durchgeführt.

Die angeborene, natürliche, oder nicht-spezifische Immunität, fasst diejenigen Verteidigungsmechanismen zusammen, die einen Organismus gegen Infektionen schützen, ohne dafür vorher spezifischen Antigenen ausgesetzt gewesen sein zu müssen (Bols et al., 2001). Die Untersuchungen des nicht-spezifischen Immunsystems bieten sich aus vielerlei Gründen für den Einsatz in ökotoxikologischen Studien an. Da viele Komponenten dieser Immunantwort über die Entwicklungsgeschichte stark konserviert sind (Ulevitch, 2000), ergibt sich die Möglichkeit, in verschiedenen Arten und Organisationsformen vergleichbare Reaktionen auf Umweltchemikalien zu beobachten und dadurch deutliche Vorhersagen über die Effekte dieser Chemikalien auf Lebensgemeinschaften treffen zu können.

In den vergangenen 20 Jahren wurden verschiedene Feldstudien über morphologische Veränderungen von Makrophagen Aggregaten unter Schadstoffeinfluss durchgeführt, nicht aber über funktionelle Veränderungen. Die Bedeutung und die Mechanismen dieser Effekte sind daher weithin unklar geblieben (zusammengefasst in Bols et al., 2001) und die Ergebnisse kontrovers. Während einige Autoren eine Vermehrung von Aggregaten in der Leber unter Schadstoffbelastung feststellten (Kranz und Gercken, 1987), fanden andere keine Reaktion (Haaparanta et al., 1996). Die weitere Erforschung von Funktionen und Mechanismen des angeborenen Immunsystems in der Leber von Fischen ist daher unabdinglich. Zum Einen für den Einsatz sinnvoller, aussagekräftiger „Biomarker“ für Immunmodulation im Kontext eines integrierten biologischen Effektmonitorings (siehe Kapitel 3) und zum Anderen für die Folgenabschätzung schadstoffbedingter Immunmodulation für Fischpopulationen. Dies bildet die konzeptionelle Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Aber nicht nur Schadstoffe sind in der Lage die Immunabwehr zu modulieren. Die mikrobizide Aktivität von Makrophagen baut auf zwei prinzipiellen physiologischen Prozessen auf: Phagozytose und intrazelluläres Abtöten (Potoka et al., 1998). Von Parasiten wird die Modulation dieser Prozesse als Strategie genutzt, um der Abwehr des Wirtes zu entgehen, beziehungsweise ihre Effektivität herabzusetzen, und so ihr eigenes Überleben im Wirt zu sichern.

Einige Arten haben diese „Kunst“ so weit verfeinert, dass sie Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel die Makrophagen als "Transportvehikel" (Dykova, 1995), oder auch als eigentlichen Wirt nutzen, indem sie den „respiratory burst“ inhibieren (Leiro et al., 2000, 2001A, 2001B) oder die Fusion von Phagosom und Lysosomen verhindern (Jones und Hirsch, 1972, Weidner, 1975, Weidner und Sibley, 1985).

In dieser Arbeit wird eine Infektion mit Myxosporidien in der Leber von Meeräschen zweier unterschiedlich stark anthropogen belasteter Standorte aus dem Mittelmeer als Modell für die Untersuchung kombinierter Schadstoff/Parasiten Modulation der Makrophagenfunktionen genutzt.

## **Makrophagen und ihre Aggregate in Fischen**

### Eine kurze Zusammenfassung der Literatur

Fische sind die älteste und mit mehr als 20.000 Arten auch die vielfältigste Wirbeltiergruppe. Diese Vielfalt spiegelt sich auch im angeborenem Immunsystem wieder, welches Unterschiede zwischen den verschiedenen phylogenetischen Entwicklungsstufen zeigt (Agius, 1980). In Knochenfischen findet man blutbildendes Gewebe im Stroma der Milz und im Interstitium der Niere, sowie in der Kopfniere. In einigen Arten findet die Blutbildung außerdem in den periportalen Bereichen der Leber, den Gonaden, der intestinalen Submucosa und im spezialisierten lymphopoetischen Organ, dem Thymus statt. Das Hauptorgan für die Blutbildung in Fischen ist die Kopfniere (Pronephros) (Stave et al., 1983).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Makrophagen als Teil des innaten Immunsystems sind phylogenetisch viel älter, als die erst später entstandenen Lymphozyten der erworbenen Immunität (Stuart, 1970). Makrophagen stehen im Zentrum der Immunabwehr bei Wirbeltieren. Zum Einen werden sie durch ihre phagozytische Aktivität der nicht-spezifischen, zellulären Immunantwort zugerechnet, zum Anderen modulieren sie die spezifische Immunität durch die Produktion und Freisetzung von Cytokinen und die Präsentation von Antigenen. Ihre Funktionsfähigkeit bildet daher die Basis für die Aufrechterhaltung der Gesundheit in Fischen. Makrophagen gehören zu den weißen Blutkörperchen und sind ein grundlegender Bestandteil des retikulo- endothelialen Systems (RES) von Wirbeltieren. Das RES kann als das ursprüngliche Verteidigungssystem angesehen werden, das Lebewesen in die Lage versetzt, sich vor potentiell schädigenden Einflüssen ihrer Umwelt zu schützen. Die Funktion der Makrophagen besteht dabei darin, Pathogene, Fremdpartikel oder Zellabbauprodukte durch Phagozytose aus dem Gewebe zu entfernen (Ellis, 1978, Agius, 1980, Mori 1980, Tsujii und Seno, 1990, Vogelbein et al., 1987). Außerdem bekleiden sie Funktionen in nahezu allen Immunreaktionen. Sie fungieren als Effektoren, Helferzellen und Suppressoren (Nathan et al., 1981).

Im Verlauf der Entwicklungsgeschichte aquatischer Vertebraten erfuhren die Makrophagen eine Wandlung in Bezug auf ihre Funktionen und Hauptaufenthaltssorte (Agius, 1980). Von den Cyclostomata zu den Osteichthyes ist eine Veränderung der Häufigkeiten der Makrophagen und der Makrophagen Aggregate von der Leber (in den primitiveren Formen) hin zu Milz und Niere (in den höher entwickelten Teleostei) zu beobachten. In allen Knorpelfischarten mit Ausnahme der Chimären und in den primitiveren Knochenfischarten fand Agius (1980) in der Leber mehr pigmentierte Makrophagen als in der Milz und in der Niere. Während in den Agnatha und Knorpelfischen pigmentierte Makrophagen vereinzelt in den Geweben vorkommen, bilden sich bei den Knochenfischen, außer bei den Salmoniden, aus diesen Einzelzellen organisierte Makrophagen Aggregate (MA).

Die Mechanismen der MA-Bildung sind trotz zahlreicher Untersuchungen noch nicht vollständig aufgeklärt. In Milz und Niere höherer Teleostei kommt es nach Injektion von Kohlepartikeln zu deren Aufnahme durch Einzelmakrophagen, die daraufhin Aggregate bilden, beziehungsweise in schon bestehende Aggregate einwandern (Ellis und Sousa, 1974, Mori, 1980). Einen ähnlichen Mechanismus ermittelten Tsujii und Seno 1990 in der Niere des Seepferdchens. Ziegenfuß und Wolke verfolgten 1991 die Kinetik der Makrophagen Aggregate mit Hilfe von fluoreszierenden Mikrosphären und bestätigten diese Ergebnisse für Niere und Milz. Untersuchungen über MA-Bildungen in der Leber sind demgegenüber sehr selten und beziehen sich in den meisten Fällen auf Reaktionen auf Krankheitserreger (Vogelbein et al., 1987). Über den Bildungsmechanismus besteht noch Unklarheit. Diskutiert wird allerdings eine Bildung von MA nach dem Muster der Granulombildung höherer Vertebraten durch Einwanderung von Monozyten aus dem Blutkreislauf, die sich nach der Einwanderung in das Gewebe zu Makrophagen umwandeln.

## Die Morphologie von Makrophagen Aggregaten der Plattfischleber

In der Leber von Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) wurden 4 verschiedene Typen von Makrophagen Aggregaten beobachtet, die unter Umständen unterschiedliche "Reifegrade" der Zentren darstellten (Broeg, in prep.).

### Typ I - kleine kompakte Makrophagen Aggregate

Dieser Typ bestand aus extrem dicht gepackten Makrophagen, war in den meisten Fällen kreisrund und in das Bindegewebe der Gallengänge bzw. Gefäße oder in das Lebergewebe eingebettet. Folgende Merkmale wurden beobachtet:

- Zellgrenzen zwischen den einzelnen Makrophagen waren lichtmikroskopisch nicht zu erkennen.
- Die Kerne der Makrophagen waren oval bis hufeisenförmig gebogen, extrem heterochromatisch und ohne deutlich erkennbaren Nucleolus.
- In den Makrophagen fanden sich Vakuolen unterschiedlicher Größe und Gestalt, ganz vereinzelt waren Fetttropfchen vorhanden.
- Das Zytoplasma erschien eosinophil und PAS- positiv.
- Die Bindegewebsfärbung zeigte eine dünne bindegewebige Hülle um die MA.

### Enzym und Pigmentgehalt

- Die Vakuolen enthielten unspezifische Esterase, alkalische Phosphatase, saure Phosphatase und  $\beta$ -N-Acetylhexosamidase, was sie als Lysosomen auswies (DeDuve und Wattiaux 1966).
- Als Pigment wurde Lipofuscin nachgewiesen.
- Esterase und saure Phosphatase zeigten im Vergleich zu anderen MA-Typen eine mittlere Aktivität.
- Der Lipofuscinegehalt war ebenfalls mittelmäßig hoch.

### Typ II - große kompakte Makrophagen Aggregate

Bei diesem Typ war eine Vergrößerung der Aggregate festzustellen. Diese wirkten dabei aber kondensierter. Die Zellgrenzen der einzelnen Makrophagen waren deutlich erkennbar, die Bindegewebshülle erheblich verstärkt. Die Räume zwischen den Makrophagen waren von einer Art Netzwerk erfüllt.

- Fetttropfchen waren regelmäßig zu beobachten, das Zytoplasma wirkte stärker strukturiert, als in den kleinen kompakten MA. Neben Vakuolen unterschiedlicher Form und Größe traten kleine eosinophile Einschlüsse auf.
- Die Kerne erschienen zum Teil kleiner und dunkler. Die Zahl der Vakuolen hatte gegenüber den kleinen kompakten MA stark zugenommen. Die Struktur des Zentrums wirkte gefestigt bzw. festgelegt.
- Regelmäßig anzutreffen waren spindelförmige Einschlüsse, wobei sich nicht klar erkennen ließ, ob es sich um intrazelluläre Einschlüsse handelte, oder um erweiterte und verstärkte Interzellularräume.
- Bei den Typ I- MA konnte häufig die Zuwanderung von Einzelmakrophagen beobachtet werden, bei den Typ II- MA selten.

- Oftmals kam es zu einer Verformung der MA, die sich bei genauerer Betrachtung als "Umschlingung" von Hepatozyten aus dem Randbereich der Aggregate herausstellte. Mit diesem Vorgang wurden ganze Hepatozyten in die MA aufgenommen. Diese Leberzellen waren in den meisten Fällen extrem vakuolisiert.

*Enzym- und Pigmentgehalt:*

- Die Aktivität der unspezifischen Esterase, der sauren Phosphatase und der alkalischen Phosphatase war höher als bei den kleinen kompakten Makrophagen Aggregate.
- Die statistische Auswertung ergab, daß Fische, die einen hohen Anteil großer kompakter MA vorwiesen, ebenfalls hohe alkalische Phosphatase-, saure Phosphatase- und Esterase-Aktivität vorwiesen.
- Der Lipofuscinegehalt war gegenüber den kleinen kompakten Makrophagen erhöht.

Typ III -postlysosomale Makrophagen Aggregate

MA dieses Typs waren in der Regel noch stärker vergrößert, als die Typ II- MA. Ihre Vakuolen und Residualkörper füllten die ganzen Makrophagen aus. Sehr häufig sah man langgestreckte und spindelförmige Vakuolen, die im Lichtmikroskop leer erschienen, also nicht angefärbt waren.

- Kreisrunde Fetteinschlüsse waren verbreitet.
- In den Zellen fanden sich vereinzelt eosinophile Einschlüsse.
- Die Kerne waren extrem klein und dunkel.

Durch ihre Größe verengten die postlysosomalen MA Gefäße und verdrängten Lebergewebe. Sie wirkten nicht mehr so konzentriert wie die großen kompakten MA und dehnten sich ins umliegende Gewebe aus.

*Enzym- und Pigmentgehalt*

Der Gehalt an Esterase und saurer Phosphatase war in diesen Aggregate niedriger, als in den großen kompakten und kleinen kompakten MA. Dagegen zeigte sich ein gegenüber den anderen Typen zum Teil erheblich angestiegener Gehalt von Lipofuscin und parallel dazu eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Typ IV- Makrophagen Aggregate im Auflösungsstadium

Dieser Typ zeichnete sich durch die Auflösung der ursprünglich runden Aggregat-Struktur aus. Die Auflösung der Aggregate ging oftmals mit einer Neubildung von Bindegewebe einher. Erstaunlich dabei war, daß der Lipofuscinegehalt mit steigender Auflösungsstendenz fiel. Das heißt, daß die Makrophagen, die mit Lipofuscin angefüllt waren, aus den Aggregate auswandern müssen. Da aber auch im Lebergewebe selbst keine mit Lipofuscin gefüllten Makrophagen zu beobachten waren, liegt die Vermutung nahe, daß diese ganz aus der Leber auswandern, beziehungsweise ausgeschleust werden.

Höhere Knochenfische haben eine in etwa gleiche Anzahl von MA in Milz und Niere und diese ist in der Regel höher, als in der Leber. In einigen hochentwickelten Arten, wie zum Beispiel dem Steinbutt finden sich in der Leber unter "normalen" Umständen, das heißt ohne den Einfluss von Pathogenen und/oder Schadstoffen keine pigmentierten Aggregate mehr. Bei Bedarf, zum Beispiel toxisch bedingter Schädigung des Lebergewebes, wandern allerdings auch bei diesen Arten Makrophagen in das Lebergewebe ein und bilden dort Aggregate



(Broeg et al., 2002, eingereicht ). Diese ähneln Granulomen, sind allerdings organisiert wie die oben beschriebenen Makrophagen Aggregate der primitiveren Knochenfischarten in der Leber. Vorherrschendes Pigment in diesen Aggregaten ist das gelblich-braune Lipofuscin, ein Endprodukt, das durch die Peroxidation ungesättigter Lipide beim Abbau geschädigter zellulärer Komponenten, wie zum Beispiel Mitochondrien entsteht und auch im Zusammenhang mit bakteriellen und virösen Erkrankungen sowie toxischer Belastung gebildet wird (Agius und Agbede, 1983, Brown und George, 1985, Broeg et al., 2002). Vergleichende Untersuchungen haben Veränderungen in Größe, Anzahl und Pigmentation der MA in Verbindung mit Alter, Gesundheit und Ernährungszustand bestimmter Fischarten, sowie in Verbindung mit Umweltbelastung nachgewiesen (Agius und Roberts, 1981, Blazer et al., 1987, Macchi et al., 1992, Payne und Fancey, 1989, Kranz und Gercken, 1987, Kranz, 1989, Kranz und Peters, 1984, Murchelano und Wolke, 1991).

Die Verlagerung der Makrophagen Aggregate aus der Leber in die lymphatischen Organe wurde mit einer Veränderung der Aufgaben der Makrophagen erklärt. Ursprüngliche Aufgabe war ausschließlich Phagozytose und Aufbewahrung unverdaulichen Materials in der Leber, dem Hauptorgan für alle metabolischen Aktivitäten. Dort verblieben die Aggregate aus Mangel an einem entwickelten retikulären und lymphatischen System. Mit der Entwicklung lymphatischen Gewebes in Milz und Niere wurden die Aggregate aus der Leber verlagert und es kam auch zu einer Erweiterung der Aufgaben von Makrophagen als immunologisch aktive Zellen (Tam et al., 1976). Daraus wurde gefolgert, dass Makrophagenfunktionen zahlreicher und komplexer wurden, parallel zur Entwicklung lymphoider Organe und der Diversifikation der lymphoiden Zelltypen. Die Fähigkeit, Makrophagen Aggregate bei Bedarf auch in anderen Organen, als den lymphatischen bilden zu können, blieb aber auch den höheren Knochenfischarten erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Fischarten und die Verteilung von Makrophagen Aggregaten auf die verschiedenen Organe (ergänzt nach Agius, 1980):

	<i>Milz</i>	<i>Niere</i>	<i>Leber</i>	<i>Pigmentierung</i>
Familie Mugilidae	xxxx	xx	xx	gelb
Familie Pleuronectidae	xxxx	xxxx	x(x)	gelb/braun
Familie Siganidae	xx	xx	xx	gelb/braun

### **Untersuchte Schlüsselfunktionen in Makrophagen und Makrophagen Aggregaten**

Ein Phagozyt, der noch keine Krankheitserreger oder degenerierte Zellbestandteile phagozytiert hat, befindet sich im Ruhezustand. Sein Metabolismus läuft auf basalem Niveau (Klein, 1991). Er kann jedoch auf eine Vielzahl von Stimuli reagieren, die seine Transformation in einen Zustand gesteigerter Phagozytoseaktivität bewirken (Secombes et al., 1988, Chung und Secombes, 1987, Klein, 1991, Lowrie et al., 1985). In das Gewebe, wie im Fall der vorliegenden Arbeit in das Lebergewebe eingewanderte, beziehungsweise einwandernde Makrophagen, werden als Gewebsmakrophagen bezeichnet. Im Folgenden werden eine Reihe von Schlüsselfunktionen beschrieben, die mit der Aktivierung von Makrophagen einhergehen. Ziele dieser Aktivierung sind eine gesteigerte biozide Wirkung gegenüber eingedrungenen Pathogenen, eine erhöhte Phagozytoseaktivität, um die

Eindringlinge aufzunehmen und eine verstärkte Aktivität hydrolytischer Enzyme in den Lysosomen, um den Abbau des aufgenommenen Materials durchführen zu können. Wird eines dieser Ziele nicht erreicht, so kann es zu Massentod von Pathogenen kommen, oder diese können, wie im Fall einiger Erkrankungen, wie zum Beispiel der Tuberkulose, in den Makrophagen überleben und sich im Wirt fortpflanzen. Alle für die Effektivität der Makrophagen im Kampf gegen Eindringlinge essentiellen Stoffwechselwege werden von Enzymen katalysiert. Zentrale Enzymsysteme wurden in dieser Arbeit auf ihre Modulation aufgrund von Schadstoffwirkung und Parasiteninfektion in verschiedenen Fischarten und Meeresgebieten überprüft. Dass diese Enzyme auch in Makrophagen Aggregaten in der Leber von Fischen aktiv sind, wurde in Vorstudien anhand von Expositionsexperimenten am Steinbutt nachgewiesen (Broeg et al., eingereicht).

In Abbildung 1 werden einige im Rahmen dieser Arbeit als Schlüsselfunktionen von Makrophagen untersuchte Stoffwechselwege dargestellt.

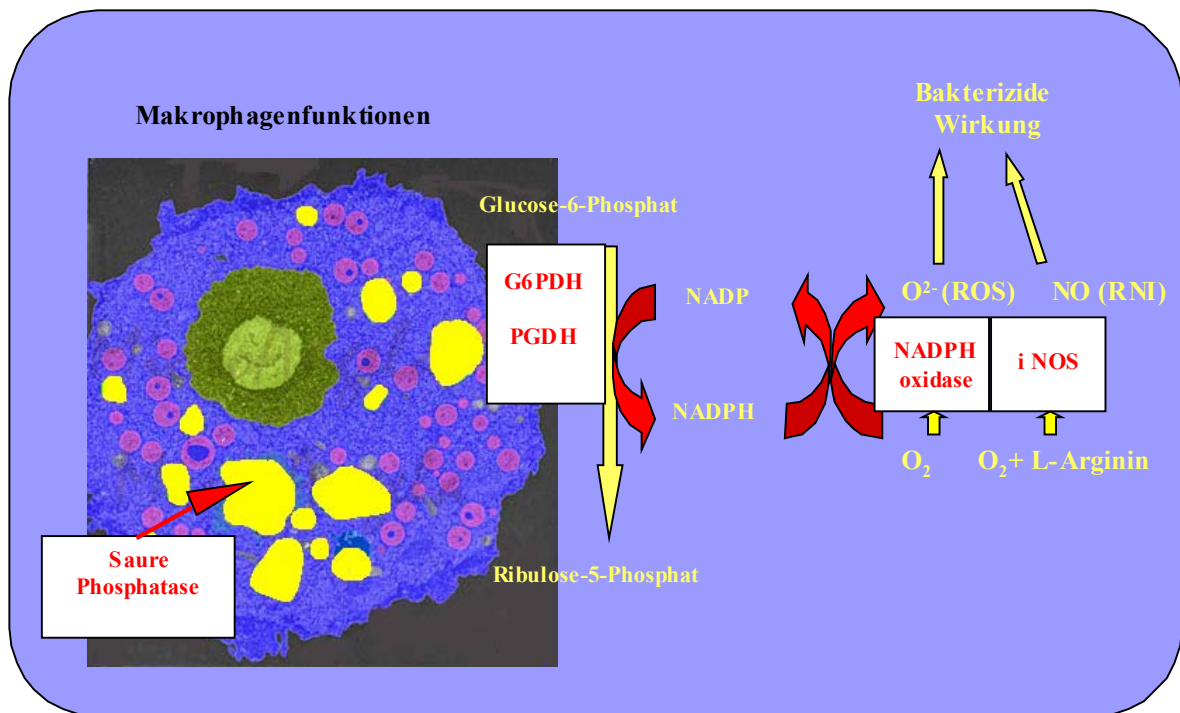


Abb. 1: Stoffwechselwege von Makrophagen (rot), die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.

Neben der mittleren Größe der Aggregate und der Anzahl der MA pro mm<sup>2</sup> Lebergewebe wurden die Aktivitäten der im folgenden Abschnitt kurz beschriebenen Enzyme gemessen:

*Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) E.C. 1.1.1.49*

Die G6PDH reguliert den Kohlenstofffluss durch den Pentosephosphatweg und ist somit das Umsatz-limitierende Enzym dieses Stoffwechselweges. Dieser Zyklus produziert NADPH für die Aufrechterhaltung des Redox Status der Zelle, sowie für reduktive Biosynthesen (Eggleston und Krebs, 1974). Für die Fragestellung dieser Arbeit war insbesondere die Bereitstellung von NADPH für die Erzeugung von radikalen Sauerstoffmetaboliten in Verlauf des „respiratory burst“ von Phagozyten von Interesse.

Dieser Prozess der Erzeugung reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROS), in der Hauptsache des Superoxid-Radikals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), wird von einer membrangebundenen NADPH-Oxidase katalysiert und wurde, nachdem er in Säugetiermakrophagen beschrieben war (Adams und Hamilton, 1984) auch in Fischmakrophagen nach Stimulation nachgewiesen (Secombes et al., 1992, Secombes, 1994, Zelikoff et al., 1995). Die NADPH-Oxidase benötigt neben Sauerstoff die reduzierte Form des NADP als Substrat. Die Intensität des „respiratory burst“ wird durch Schadstoffeinfluss (Insektizide, Herbizide, Fungizide, PAKs, PCBs, TBT, zusammengefasst von Dunier und Siwicki, 1993, Schwermetalle, zusammengefasst von Zelikoff, 1993) moduliert, wie bereits in zahlreichen Studien an isolierten Phagozyten untersucht worden ist. Parallel zu dieser Arbeit wurde als Teil einer anderen Dissertation in den selben Organismen ebenfalls an isolierten Phagozyten der Kopfniere die Erzeugung reaktiver Sauerstoffmetabolite gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die G6PDH untersucht, da sich die Aktivität dieses Enzym als sehr sensibel gegenüber Schadstoffeinfluss gezeigt hat (Köhler und Van Noorden, 1998, Winzer und Köhler, 1998, Winzer et al., 2001). Eine ausreichend hohe Aktivität der G6PDH ist nötig, um genügend Substrat für eine effektive Reaktion des „respiratory burst“ zur Verfügung zu stellen. Für die Erzeugung reaktiver Sauerstoffmetabolite in Phagozyten stellt die G6PDH aus diesen Gründen ein wichtiges Schlüsselenzym dar. Die Aktivität der G6PDH ist außerdem im Rahmen des Abbaus von Sauerstoffradikalen in den Phagozyten von grundlegendem Interesse, da das von ihr erzeugte NADPH von der Glutathion-Reduktase zur Reduktion von Glutathion benötigt wird. Glutathion wandelt im reduzierten Zustand unter Katalyse der Glutathion-Peroxidase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Wasser um (Abb. 2). Diese Enzymreaktionen sind für Phagozyten als Schutz vor oxidativem Stress von außerordentlicher Wichtigkeit.

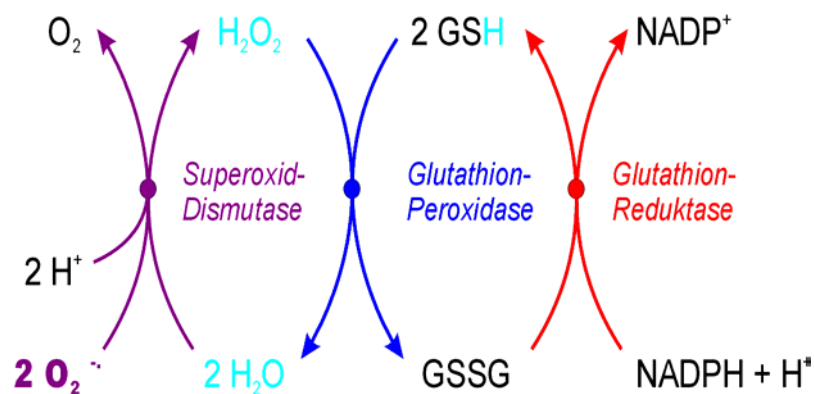


Abb. 2: Vereinfachtes Schema der Kooperation der Enzyme bei der Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten und der Rolle von NADPH (nach Stryer, 1988).

#### *Phosphogluconat Dehydrogenase (PGDH) E.C. 1.1.1.44*

In Verlauf des Pentosephosphatweges wird noch in einer weiteren Reaktion NADPH erzeugt. Das katalysierende Enzym in diesem Schritt ist die PGDH. Im Gegensatz zur G6PDH scheint die PGDH Aktivität im Lebergewebe von Flundern nicht so sensibel auf Schadstoffeinfluss zu reagieren (Van Noorden et al., 1997). Auch die PGDH-Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft um der Frage nachzugehen, ob es bei eventueller Inhibition der G6PDH zu einer kompensatorischen Erhöhung der PGDH-Aktivität kommen würde.

Untersuchungen darüber, welches der beiden NADPH erzeugenden Enzyme in Fischmakrophagen bei der Bereitstellung dieses reduzierten Coenzym für die NADPH-oxidase in welchem Maß zuständig ist, liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht vor. Aktuelle Untersuchungen von Baier-Anderson und Anderson (2000) konzentrierten sich bei ihren Untersuchungen alleine auf die G6PDH als Schlüsselenzym des Pentosephosphatweges.

#### *Saure Phosphatase (SP) E.C. 3.1.3.2*

Mit der Phagozytose von Pathogenen und abbaubarem Material kommt es in Phagozyten zu einer Erhöhung der Aktivität lysosomaler Enzyme. Dies wurde sowohl in Säugetiermakrophagen (Klein, 1991), als auch in Fischmakrophagen nachgewiesen (Chung und Secombes, 1987, Broeg et al. subm.). Ein Schlüsselenzym hierbei ist neben den unspezifischen Esterasen die Saure Phosphatase.

In Säugetiermakrophagen wurde festgestellt, dass die Aktivität hydrolytischer Enzyme in stimulierten Zellen höher ist, als in nicht-stimulierten (Hard, 1970). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Phagozytose verdaubarer Substrate eine konzentrationsabhängige Induktion lysosomaler Enzyme zur Folge hatte, die Phagozytose von nicht verdaubarem Material hingegen nicht (Pesanti und Axline, 1975). Eine Herabsetzung der Aktivität lysosomaler Enzyme durch Schadstoffeinfluss könnte bedeuten, dass es zum Beispiel phagozytierten, aber nicht abgetöteten Pathogenen und Parasiten gelingen könnte in den Makrophagen zu überleben und sich fortzupflanzen, sie also als Wirt zu nutzen, wie zum Beispiel Mycobakterien. Eine ausreichend hohe Aktivität der Sauren Phosphatase ist aus diesem Grund von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Fischgesundheit und stellt daher eine Schlüsselfunktion der unspezifischen Immunantwort dar.

#### *Nitritoxid Synthase (NOS) EC 1.14.13.39*

Die NOS katalysiert die oxidative Umwandlung von L-Arginin zu NO und Citrullin in einer NADPH-abhängigen Reaktion. NO ist sowohl ein wirksames Botenmolekül in der Signaltransduktion, da es die lösliche Isoform der Guanylat-Cyclase stimuliert, als auch eine Komponente der Immunantwort auf Infektionen. Außerdem ist sie beteiligt in der neuronalen Entwicklung und der Apoptose (Jaffrey und Snyder, 1996).

Es existieren zwei Klassen von NOS-Isoformen:

- i. Die konstitutiven Isoformen, die aktiviert werden durch die Bindung eines  $\text{Ca}_2^+$ /Calmodulinkomplexes und ursprünglich aus dem Cerebellum und dem endothelialen glatten Muskelgewebe isoliert worden sind (endotheliale NOS (eNOS) und neuronale NOS (nNOS)).
- ii. Die Cytokin-induzierten Isoformen, die über die Transkription reguliert werden und sich mit Calmodulin zu einer Untereinheit verbinden (induzierbare NOS (iNOS)) (Perry und Marletta, 1998).

Diese Isoformen werden im Verlauf von Immunreaktionen in Leukozyten induziert, um mit Hilfe der erzeugten Stickstoffradikale Pathogene zu schädigen, beziehungsweise abzutöten. Die reaktiven Stickstoffintermediate (RNI) zu denen auch Stickoxid zählt, sind in der Lage eine breite Palette von Pathogenen zu inhibieren, zu denen Viren, Bakterien, Pilze, Einzeller, Helminthen und auch Tumorzellen gehören (Clark and Rockett, 1996). Über diese Reaktion hinaus können sich Stickoxide mit reaktiven Sauerstoffmetaboliten, insbesondere mit Superoxid ( $O_2^-$ ), was innerhalb der Reaktion des „respiratory burst“ produziert wird, zu Peroxynitrit verbinden, einem noch reaktiveren freien Radikal (Ischiropoulos et al., 1992, Carreras et al., 1994).

Alle Isoformen haben eine homodimere quaternäre Struktur, die die Voraussetzung für die katalytische Wirkung der NOS ist. Jede monomere Untereinheit enthält FAD, FMN, (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-Biopterin ( $H_4B$ ) und Protoporphyrin IX Häm (Marletta, 1994). Das NOS Häm gleicht dem Cytochrom p450 mit einem Eisen-CO-Komplex mit einer maximalen Wellenlänge von 445 nm.



Abb. 3: Katalytische Wirkung der Nitrit Oxid Synthasen

#### *Aldehyd Dehydrogenase (ALDH) E.C. 1.2.1.3.*

Die Aldehyd Dehydrogenase (ALDH) gehört zu den Enzymsystemen, die, wie die Cytochrom P450 abhängigen Oxygenasen über den Ah-Rezeptorweg gesteuert werden. Aufgabe der Aldehyddehydrogenasen ist es, auf Stoffwechselwegen, oder im Verlauf von Radikalreaktionen entstandene cytotoxische Aldehyde zu reduzieren, was für die betroffene Zelle einer Entgiftung dieser Aldehyde gleichkommt (Benedetti, 1980, Harvey und Lindahl, 1982, Winzer und Köhler, 1998). Die Toxizität einiger Aldehyde äußert sich in der Inhibition des Energiestoffwechsels, der Proteinbiosynthese und der Zellteilung (Schauenstein et al., 1967). Die Frage in dieser Arbeit war, ob eine erhöhte Aktivität von Makrophagen aus der Kopfniere und Aggregaten in der Leber mit einer Induktion der ALDHbenz (Benzaldehyd als Substrat und  $NADP^+$  als Cofaktor) einhergeht. Dieses Isoenzym wurde auch aus dem Grunde untersucht, da seine Aktivität eine weitere Quelle für NADPH darstellt (Lindahl, 1982), dem Cofaktor für die ROS-produzierende NADPH-Oxidase in Makrophagen. Eine erhöhte Aktivität der ALDHbenz hätte also in Phagozyten neben der Entgiftung von durch Lipidperoxidation entstandenen Aldehyden auch die Lieferung von weiteren Reduktionsäquivalenten für die ROS-Produktion zur Folge.

## Untersuchte Fischarten

In der Nordsee wurden die Untersuchungen an der Flunder (*Platichthys flesus* Linnaeus, 1758) durchgeführt. Diese euryhaline Plattfischart, die zur Familie der Pleuronectidae, Unterfamilie Pleuronectinae gehört, ist und wird in zahlreichen Projekten und in biologischen Effektmonitoring Studien in Nord- und Ostsee als Indikatorart eingesetzt. Durch ihre Lebens- und Ernährungsweise steht sie zum Einen im direkten Kontakt zu den belasteten Sedimenten, zum Anderen steht sie als carnivorer Organismus weit hinten in der Nahrungskette, was zur Bioakkumulation von Xenobiotika beiträgt. Die Flunder kommt in Tiefen von 1m bis 100m, im Süßwasser, Brackwasser und im marinen Milieu vor und bevorzugt sandige und schlickige Untergründe. Nahrungsgrundlage bilden vor allem Invertebraten und kleine Fische.

Man findet die Flunder im Ostatlantik, im Brackwasserbereich Westeuropas, vom Weißen Meer bis zum Mittelmeer und im schwarzen Meer (Muus und Dahlström, 1978). In die USA und Kanada wurde sie mit dem Ballastwasser von Schiffen eingeschleppt (Welcomme, 1988). Durch die Verkleinerung der Schollenpopulationen in der Nordsee wird sie seit einigen Jahren auch wieder kommerziell genutzt. Die Jungtiere leben in den flachen Küsten- und Ästuarbereichen, die Ebenfalls den Sommeraufenthaltort und die Nahrungsgründe der adulten Fische darstellen. Während des Winters wandern die adulten Flundern in tiefere, wärmere Wasser, wo sie ablaichen. Die Laichsaison geht bis in das frühe Frühjahr (März/ April) (Cooper and Chapleau, 1998).



Abb. 4: *Platichthys flesus*, Quelle: fishbase.de.

Indikatorart der israelischen Mittelmeerküste war die Meeräschenart *Liza aurata*, die zur Ordnung der Perciformes und zur Familie der Mugilidae gehört. Mit einer maximalen Größe von 59 cm kommt die pelagisch lebende Meeräschenart im marinen und im Brackwasserbereich in einer Tiefe von bis zu 10m vor. Das Verbreitungsgebiet sind die temperierten Meeresgebiete von 64°N - 20°N. *Liza aurata* ist eine Fischart, die kommerziell gefischt, aber auch in Aquakulturen gehalten wird. Sie hält sich im Ostatlantik von Schottland bis Cap Verde, im Mittelmeer und im Schwarzen Meer auf. Ebenso in den Küstengewässern des südlichen Norwegens.

Nahrungsgrundlage bilden kleine benthische Organismen, Detritus und seltener Insekten und Plankton. Die Reproduktionszeit dieser Art liegt im Spätsommer zwischen Juli und Oktober (Thomson, 1986).



Abb. 5: *Liza aurata*, Quelle: fishbase.de

Im Roten Meer wurde die Kaninchenfischart *Siganus rivulatus* untersucht. Diese herbivore Fischart, die sich “grasend” auf Algen ernährt, gehört ebenfalls zur Ordnung der Perciformes, Familie Siganidae. Die Maximalgröße von *Siganus rivulatus* kann bis zu 40 cm betragen. *S. rivulatus* kommt im marinen und im Brackwasserbereich in einer Tiefe bis zu 20 Metern vor, hält sich aber meistens im flachen, geschützten Küstenbereich in Schulen von 50 bis zu mehreren 100 Fischen auf. Das Hauptverbreitungsgebiet ist subtropisch (32°N - 35°S). *Siganus rivulatus* kommt im westlichen Teil des Indischen Ozeans, an der Küste Ostafrikas vor und ist vom Roten Meer aus über den Suezkanal in das östliche Mittelmeer eingewandert (Lessepscher Migrant) (Woodland, 1990).

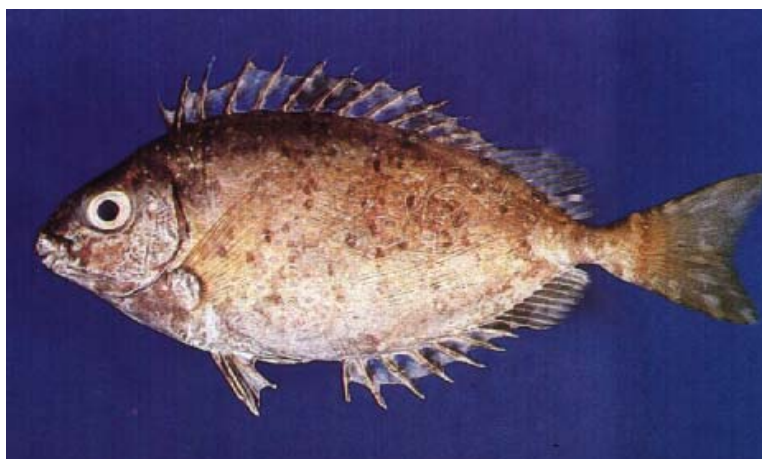


Abb. 6: *Siganus rivulatus*, Quelle: fishbase.de

Gemeinsam ist allen drei ausgewählten Fischarten, dass sie sowohl im Brackwasser, als auch in marinen Salinitäten leben. Dies macht sie für die Nutzung im biologischen Effektmonitoring zu einem brauchbaren Indikatororganismus, da sie auch in den besonders belasteten Ästuarbereichen mit geringerer Salinität vorkommen können. Die Flunder hat von allen drei Arten die höchste Toleranz gegenüber Salzgehaltsveränderungen, da sie auch regelmäßig in Süßwasser vorkommt und somit auch als Indikator im Süßwasserbereiches der Flüsse eingesetzt werden kann und nicht nur im Tidenbereich. *Liza aurata* geht nur gelegentlich in Süßwassergebiete und *Siganus rivulatus* gar nicht.

Wichtig bei der Auswahl der jeweiligen Indikatorarten war, dass die Fische für die Untersuchungen immer verfügbar sind und eine gewisse Standorttreue aufweisen, da ansonsten eine Aussage über die Umweltqualität und die Effekte die durch die Belastung der jeweiligen Regionen hervorgerufen wurden nicht spezifiziert werden könnten. Bei standorttreuen Fischen kann mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden, dass ihre physiologischen Reaktionen auf die Schadstoffbelastung ihrer "Heimatgebiete" zurückzuführen ist.

## **Beschreibung der untersuchten Meeresgebiete**

### *Nordsee*

In der Nordsee wurden insgesamt 5 verschiedene Stationen untersucht. In der ersten Phase diese Studie (1995/1996), in der die Anwendbarkeit der Parameter im Vordergrund stand, wurden drei Stationen ausgewählt, die, wie sich in vorherigen Projekten gezeigt hatte, eine Art Schadstoffkonzentrationsgradienten repräsentieren. Die am stärksten belastete Station lag direkt in der Elbemündung (1), es folgte eine Station am Norderpiep, der "Außeneider" (2) und die Station, die als am geringsten belastet angesehen wurde, die Tiefe Rinne vor Helgoland (3) (Abb. 7).

In der zweiten Phase (1997-2000), der Anwendung der entwickelten Parameter im Feld, wurden noch zwei weitere Stationen hinzugefügt:

Eine Station direkt hinter dem Eidersperrwerk (5), als direkte Referenzstation zu Elbemündung. Die Referenzstation Tiefe Rinne unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht hydrografisch von der Elbmündung. Der Salzgehalt ist marin (33-36 ‰) und konstant, die Salinität in der Elbemündung schwankt extrem zwischen Brackwasser (10‰) und marin. Außerdem ist die Tiefe sehr unterschiedlich. Während die Flundern vor Helgoland aus einer Tiefe von um die 50 Metern gefischt wurden, hielten sich die Fische in der Elbmündung im Flachwasserbereich (zwischen 5 und 10 Metern) auf. Aus diesen Gründen wurde die Inneneider als eine Station ausgewählt, bei der die hydrografischen Daten denen der Elbmündung ähnlich sind, die chemische Belastungssituation aber geringer. Leider war es nicht möglich auf dieser Station zu allen Kampagnen Flundern zu fischen.

Als weitere Station wurde Spiekeroog (4) gewählt, die als höher belastet gilt, aber ähnliche hydrografische Verhältnisse wie die Referenzstation Helgoland aufwies.

### *Mittelmeer und Rotes Meer (Golf von Aquaba)*

Im Mittelmeer wurden ab dem Frühjahr 1999 zwei marine Stationen untersucht: Die hochbelastete Bucht von Haifa (6) und ein der israelischen Küste vorgelagertes Areal mit Namen Maagan Michael als Referenzgebiet (7). Ähnlich wie für die in der Nordsee ausgewählten Stationen existiert für Haifa Bay und Maagan Michael umfangreiches Hintergrundmaterial über die chemische Belastungssituation (Hornung und Kress, 1991, Herut et al., 1999, Kress et al., 1999).

Das selbe gilt für die Stationen im Roten Meer. Diese unterscheiden sich extrem in der Art der anthropogenen Belastungssituation. Eine Station ist bei einer marinen Fischfarm mit Futter-



und Medikamenteneintrag (Ardag, 8) lokalisiert, eine weitere ist direkt dem Hotelkomplex der Stadt Eilat vorgelagert (North Beach, 9). Diese beiden Stationen haben einen sandigen Untergrund. Die dritte, die Referenzstation des Golfes von Aquaba liegt direkt an der Israelisch-Ägyptischen Grenze in einem Riffareal bei einem Unterwasserobservatorium und einem Meerwasseraquarium (10).

Eine genaue Beschreibung der chemischen Belastungssituation der Stationen findet sich in den jeweiligen Kapiteln.

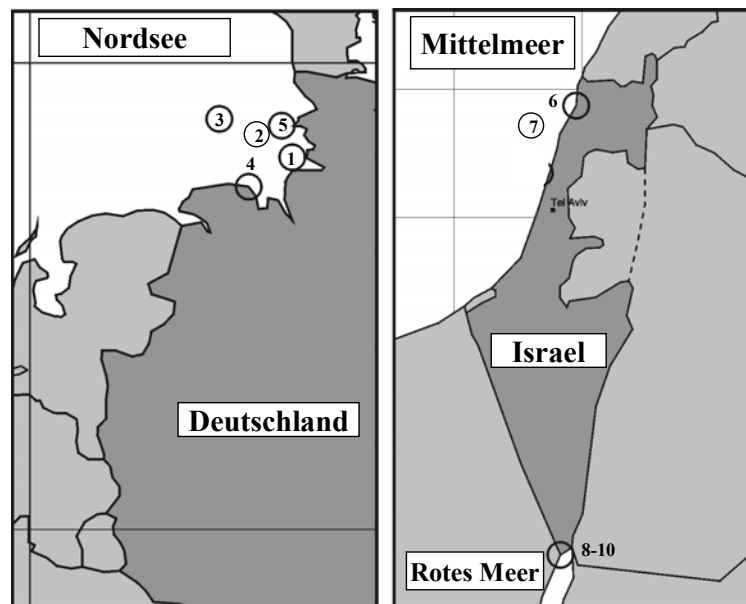


Abb. 7: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gebiete.

## Definitionen und grundlegende Anmerkungen

**Biomarker** sind Schadstoff-induzierte Veränderungen in zellulären oder biochemischen Komponenten oder Prozessen, Strukturen oder Funktionen, die messbar sind in einem biologischen System, oder einer Probe (Shugart et al., 1992).

**Ökotoxikologie** ist die Lehre des Einflusses von Umweltchemikalien auf Populationen und Ökosysteme. Seinen Anfang findet dieser Einfluss, diese Modulation „normaler“ Umweltzustände aber bereits auf sehr niedrigen Ebenen biologischer Organisation. Bereits geringe Veränderungen, seien es DNA-Schäden, oder andere zelluläre Abweichungen vom „Normalzustand“ können weitreichende Folgen für den Organismus und im Weiteren für die gesamte Population bedeuten.

Untersuchungen auf diesem Niveau haben den Vorteil, dass es möglich wird, toxikologisch bedingte Veränderungen bereits zu einem frühen Zeitpunkt zu erkennen, bevor das sprichwörtliche Kind in den Brunnen gefallen ist, das heißt bevor sich Umweltbelastung in Populations- und Ökosystemschäden manifestieren. Schädigende Einflüsse auf das Immunsystem sind hierbei von besonderer ökotoxikologischer Relevanz, weil sie die Krankheitsanfälligkeit ganzer Populationen beeinflussen können. Ökotoxikologische Arbeiten umfassen daher viele Disziplinen (Connell et al., 1999) und der Erfolg vieler Studien basiert auf der Zusammenarbeit von Chemikern, Biochemikern, Molekularbiologen, Physiologen, Pathologen, Ökologen und Mathematikern/Modellierern. Es handelt sich bei der Ökotoxikologie also um einen interdisziplinären Arbeitsbereich mit dem Ziel der Folgenabschätzung von Umweltbelastung auf verschiedenen Ebenen biologischer Organisation. Sehr enge Verbindungen gibt es bei dieser Arbeit auch mit Forschungsgebieten der Humanmedizin, Pharmakologie und Immunologie, wobei in diesen Bereichen hauptsächlich an der Aufklärung von Wirkmechanismen von Schadstoffen und pharmakologisch aktiven Substanzen gearbeitet wird. Umweltstudien können aber auch in umgekehrter Richtung Anregungen für humanmedizinische Fragestellungen geben, da breit angelegte „Feldstudien“ über den Einfluss spezifischer Schadstoffe an Menschen nicht möglich sind, aber zum Beispiel an Fischen im Rahmen von Monitoring-Untersuchungen durchaus durchgeführt werden können. Hinweise, die Veränderungen des angeborenen Immunsystems betreffen, das ja extreme Ähnlichkeiten zu dem der Säugetiere aufweist (Zelikoff 1993) können auch in humanmedizinischer Hinsicht durchaus Relevanz haben. Als Beispiele seien hier der mögliche Zusammenhang zwischen schadstoff-induzierter Induktion der Biotransformation (CYP1A1) und Aktivierung des nicht-spezifischen Immunsystems in Steinbutt (Broeg et al., eingereicht), sowie geschlechtsabhängige Bildung von Lebertumoren in Flundern (Köhler, eingereicht) genannt.

## **Aufbau der Arbeit**

Nach dieser generellen Einführung in das Thema folgt eine Beschreibung des genutzten Materials und der angewendeten Methoden. Hier werden die Probennahme, Präparation, die angewendeten Tests, die Auswertung, sowie die statistischen Methoden grundsätzlich aufgeführt. Spezielle Teile, die ausschließlich die in den einzelnen Kapiteln angewendeten Verfahren betreffen, werden in den jeweiligen Kapiteln genauer ausgeführt.

Der Ergebnisteil gliedert sich in folgende Studien:

1. Aktivität von Schlüsselenzymen in isolierten lebenden Makrophagen aus der Kopfniere
2. Auswirkungen von Salinitätsveränderungen auf Makrophagenparameter und Biomarker in der Leber von Flundern
3. Anwendung der Sauren Phosphatase Aktivität in Makrophagen Aggregaten (MA-SP) und MA-Größe als Indikatoren für Immunmodulation durch Schadstoffeinfluss . I. Grundlegende Untersuchungen der MA-SP und MA-Größe in der Flunderleber. II. MA-SP als Biomarker im integrierten biologischen Effektmonitoring
4. Aktivität von Schlüsselenzymen in MA und Lebergewebe, sowie Biomarker für toxische Effekte in der Meeräschen- und Kaninchenfischleber als Indikatoren für Schadstoffeffekte in Mittelmeer und Rotem Meer.
5. Einfluss von Parasiteninfektionen auf Immun- und Biomarkerantwort in der Leber von Meeräschen von zwei unterschiedlich belasteten Stationen der Israelischen Mittelmeerküste. I. Charakterisierung der Infektionen und Reaktion des Immunsystems.
6. Einfluss von Parasiteninfektionen auf Immun- und Biomarkerantwort in der Leber von Meeräschen von zwei unterschiedlich belasteten Stationen der Israelischen Mittelmeerküste. II. Differenzierung zwischen Infektions- und Schadstoffeffekten.

Daran anschließend folgt eine Diskussion, die sich zuerst auf die jeweiligen Ergebnisse der einzelnen Kapitel bezieht, bevor eine Gesamtzusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse vorgenommen wird.

## Material und Methoden

### Probennahmen

#### *Nordsee*

Die Probennahme in der Nordsee erfolgte mit dem Forschungskutter „Uthörn“ der Biologischen Anstalt Helgoland (BAH) am Alfred Wegener Institut für Polar und Meeresforschung (AWI) auf den Stationen: Elbe, Außeneider, Tiefe Rinne und Spiekeroog. Für jede Probennahme wurden Temperatur (Wasser/Luft) und Salinität der jeweiligen Station gemessen, sowie Windrichtung, - Stärke und Tide bestimmt. Das Grundschieppnetz hatte eine Maschenweite von 35mm am Steert und die Fangdauer wurde auf eine halbe Stunde (Netz auf Grund) beschränkt, um den Fangstreiß einheitlich und so gering wie möglich zu halten. Nach dem Hieven- dem Einholen des Netzes- wurde der Fang sofort sortiert. Flundern, die keine äußerlich sichtbaren Krankheiten aufwiesen und zwischen 18 und 25 cm lang waren wurden in 60 Liter Becken mit Belüftung und permanentem Wasserdurchlauf eingesetzt und bis zur Präparation dort gehältert (maximal 8 Stunden).

Die Station „Inneneider“ wurde mit einem kommerziellen Fischkutter befischt.

#### *Mittelmeer*

Im Mittelmeer wurden Meeräschen (*Liza aurata*) ebenfalls mit Hilfe von kommerziellen Fischern auf den Stationen Haifa Bay (belastet) und Maagan Michael (Referenz) gefangen und an Bord in belüfteten Basins mit einem permanenten Wasserdurchlauf gehältert. Die Präparation erfolgte im Labor des Kibbutz Maagan Michael.

#### *Rotes Meer*

Im Roten Meer wurden auf drei Stationen Kaninchenfische (*Siganus rivulatus*) mit Hilfe von Käfigen gefangen. Die Käfige wurden von Tauchern vorsichtig geborgen und die Fische bis zur Präparation im Eilat Marine Laboratory in belüfteten Basins mit Wasserdurchfluß gehältert.

Monat/ Jahr	09/95	01/96	04/96	07/96	10/96	03/97	09/97	04/99	09/99	04/00	09/00
<b>Elbe (1)</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Außeneider (2)</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Helgoland (3)</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Spiekeroog (4)</b>	-	-	-	-	-	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Inneneider (5)</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>X</b>	-	<b>X</b>	-

Tabelle 3A: Überblick über die Probenahme-Kampagnen in der Deutschen Bucht. X= zu den jeweiligen Zeitpunkten beprobte Stationen.

Monat/ Jahr	04/99	10/99	04/00	10/00
Haifa Bay (6)	X	X	X	-
Maagan Michael (7)	X	X	X	-
Ardag (8)	X	X	X	X
North Beach (9)	X	X	X	X
Observatory (10)	X	X	X	X

Tabelle 3B: Überblick über die Probenahme-Kampagnen in Mittelmeer und Rotem Meer. X= zu den jeweiligen Zeitpunkten beprobte Stationen.

### *Präparation*

Die Fische wurden, nachdem die Ektoparasiten abgesucht waren und Blut entnommen war, mit einem Genickschnitt getötet und enthauptet. Folgende Parameter wurden von jedem Individuum erhoben: Länge, Gewicht, Geschlecht, Reifezustand, Blickrichtung/Lage. Zur Bestimmung des Reifezustandes wurde nur zwischen Ruhe und voller Reife der Gonaden unterschieden (0/1). Von 1999 an war es zudem technisch möglich, auch Leber- und Gonadengewicht zu messen, so dass für diese Fische der lebersomatische und der gonadosomatische Index errechnet werden konnte.

Die Entnahme der Leber erfolgte mit äußerster Vorsicht, um die Gallenblase nicht zu beschädigen. Außer der Leber wurden von anderen Arbeitsgruppen auch alle anderen Organe entnommen und für parasitologische Untersuchungen fixiert. Aus der Kopfniere wurde eine Primärzellkultur aus Leukozyten gewonnen.

### *Probenahme für Enzymhistochemie*

Direkt nach Entnahme der Leber wurde dem zentralen Teil ein ca. 0,5 cm<sup>3</sup> großes Stück ohne Mesenterien entnommen und in einem Gefriergefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung des Gewebestückes erfolgte in einer Gefriertruhe bei -80°C bis zur Aufarbeitung der Proben.

### *Probenahme für Histopathologie*

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurde der Teil der Leber, der aus dem Mittelbereich entstammte (Abb.8), sowie in Stichproben auch Milz und Kopfniere in Bakers Formol fixiert. Die histopathologischen Untersuchungen dieser Arbeit konzentrieren sich auf die Leber. Die Kopfnierenhistologie bildete die morphologische Grundlage für die enzymhistochemischen Untersuchungen an lebenden Kopfnierenzellen.

### Bakers Formol:

300 ml	Formaldehyd (37 %)
60g	Calziumacetat
Auffüllen mit Aqua. dest auf 3 Liter	

Die Organe/Organteile wurden in 10 ml Schnappdeckelgläschen bei 4°C für 24 Stunden fixiert und danach in Gummi Saccharose überführt. Gummi Saccharose ist eine das Gewebe schonende, zähflüssige Lösung aus Saccharose und Gummi arabicum, in der fixierte Proben über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden können, ohne Schaden zu nehmen, zum Beispiel zu schrumpfen oder auszutrocknen.

Rezept Gummi Saccharose:

30 g Saccharose und 1g Gummi arabicum auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen.

*EROD*

Für die Bestimmung der EROD-Aktivität wurde der gesamte hintere Leberlappen genutzt. Dieser Gewebeteil wurde wie der zentrale Teil in flüssigem Stickstoff schockgefroren und verblieb bis zu den Messungen im Labor weiter in flüssigem Stickstoff.

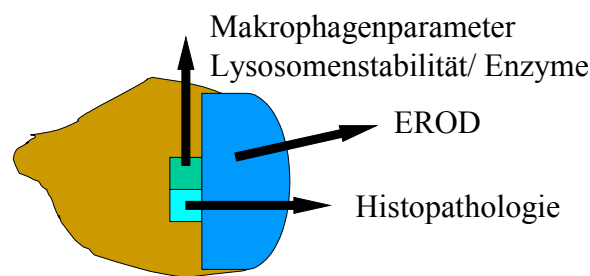


Abb. 8: Übersicht über die genutzten Gewebeteile der Leber.

*Kopfnierenprimärzellkulturen*

Die Kopfniere, sowie ein kleiner Teil der Nachniere wurden entnommen und bis zur Zellisolierung am nächsten Tag in einem sterilen Gefäß mit Nährmedium aufbewahrt.

Für die Isolation der Zellen wurde die Kopfniere auf Nylongaze (100 µm Maschenweite) gegeben und mit der Rückseite einer Spritze vorsichtig unter Zugabe von Waschmedium zerrieben. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden die Zellen aus dem Netz in ein silikonisiertes Zentrifugenröhrchen gespült. Die anschließende Zentrifugation erfolgte über 15 Minuten bei 1500 RPM (755 x g) und 5°C.

Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren vorsichtig abgossen und frisches Waschmedium aufgefüllt (5-8 ml). Mit Hilfe eines Rüttlers wurden die Zellen daraufhin resuspendiert. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt.

### Kultur- und Waschmedium RPMI-1640

Waschmedium: 100%iges RPMI-1640 unter Zusatz von:  
10iU/ml Heparin

Kulturmedium: 100%iges RPMI-1640 unter Zusatz von:  
Karpfenserum (30 µl/ml Medium)  
Penicillin (100 IE/ml Medium)  
Streptomycin (100 µg/ml Medium)  
L-Glutamin (20 µl /ml Medium, Endkonzentration 2 mM)

PMA-Stammlösung: 1mg PMA auf 1 ml Ethanol , abfüllen in 50µl Eppendorfhütchen (lagern bei -20°C).

Endlösung: 5ml Kulturmedium + 5µl PMA-Stammlösung  
Von dieser Endlösung wurden 25µl pro Makrophagensuspension (250µl) zur  
Stimulierung der Makrophagen vor den jeweiligen Enzymnachweisen eingesetzt.

Mit Hilfe des Trypanblauausschlußverfahrens (Zellsuspension:Trypanblau = 1:1) wurde  
lichmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer die Überlebensrate der isolierten Zellen  
bestimmt. Diese lag in allen Fällen über 85%.

Bis zu den histochemischen Nachweisreaktionen wurden die Zellsuspensionen maximal 6  
Stunden bei 4°C gelagert.

## **Probenaufarbeitung**

### *Enzymhistochemie*

Schnitte für die histochemischen Untersuchungen, sowie für die Bestimmung der lysosomalen Destabilisationszeit wurden von den tiefgefrorenen Proben mit Hilfe eines Gefriermikrotomes, Kryotom "Microm HM 500 OH" der Firma Microm angefertigt, die Schnittdicke betrug 10µm. Das Schneiden erfolgte bei einer Kabinentemperatur von minus 20 bis minus 25°C, wobei der Fettgehalt der Proben eine wichtige Rolle spielte. Je mehr Fett in der Probe war, desto tiefer mußte die Schneidetemperatur sein, um eine gut Schnittqualität zu erzeugen. Der Messerwinkel betrug 5°, die Schneidegeschwindigkeit 50 mm/sec. Auf jeden Objektträger wurden 2 Schnittserien gesetzt. Zur Qualitätssicherung wurde mit Hilfe der mikroskopischen Mikrometerschraube vor jeder Messung eine Kontrolle der Schnittdicke durchgeführt, indem der Abstand von der "oberen" Schärfe zur "unteren" Schärfe festgestellt wurde.

## *Histopathologie*

### Einbettung

Als Einbettungsmedium wurde der Kunstharz Methacrylat gewählt, zum Einen wegen der relativ unproblematischen Handhabung, zum Anderen wegen der Möglichkeit bis zu 2µm dünne Schnitte anfertigen zu können - ein Vorteil gegenüber der Paraffineinbettung, bei der nur dickere Schnitte möglich sind.

### Vorgehensweise bei der Einbettung:

Fixierte Gewebeteilchen wurden 2 - 3 x in Aqua dest. gespült, das Glas danach erneut mit Aqua. dest. aufgefüllt, verschlossen und 30 min. auf einem Schüttler "gewaschen".

### Entwässerung :

2 x 15 min mit 70 % igem Aceton

2 x 15 min mit 100% igem Aceton

Über Nacht wurden die Proben in Methacrylat - Monomerlösung auf dem Schüttler gespült.

### Rezept Monomerlösung:

80 ml 2 - Hydroxyethylmethacrylat (Merck, stabilisiert mit 200 ppm Hydrochinon)

12 ml 2 - Butoxyethanol (mit 25% H<sub>2</sub>O)

0.27 g Benzoylperoxid

Zur Einbettung wurden jeweils 5ml Monomerlösung mit 0.1 ml Aktivator versetzt.

### Aktivator :

10 ml Polyethylenglycol 200 (BDH)

1 ml N,N - Dimethylanilin

Das Einbettungsmedium wurde in Formen der Firma Biorad Laboratories München (Größe 12 x 16 x 5 mm , Fassungsvermögen 2ml) gefüllt und die Proben in die Form eingelegt. Kunststoffblockhalter (hergestellt in der BAH - Werkstatt), mit gekerbter Oberfläche, wurden auf die Form gesetzt, so dass die Probenblöcke nach dem Auspolymerisieren auf dem Blockhalter hafteten. Die Polymerisationszeit betrug zwischen 4 und 6 Stunden bei 4°C. Die Kühlung verhinderte die Schädigung der Enzyme durch hohe Polymerisationstemperaturen. Nachdem die Blöcke ausgehärtet waren, wurden sie aus den Formen genommen und ruhten vor der weiteren Verarbeitung mindestens einen Tag im Kühlraum. Die Anfertigung von Schnitten für die Lichtmikroskopie erfolgte mit einem Rotationsmikrotom J B-4 , Manuel Model, Bio - Rad Laboratories München. Die Schnittdicke betrug 2µm.



## **Histochemische Methoden**

### *Histochemische Methoden an Gefrierschnitten*

Die histochemischen Nachweise wurden an Einzelschnitten und nicht in Färbebecken durchgeführt. Ob und inwiefern eine Vorfixierung oder Trocknung vor der jeweiligen Inkubation erfolgte, wird in den einzelnen Abschnitten über die Enzymfärbungen beschrieben. Soweit nicht anders beschrieben, wurde das Inkubationsmedium direkt auf die frisch aufgetauten Schnitte aufgetragen, so dass jeweils das ganze Gewebe mit dem Medium gut bedeckt war. Die Inkubationen erfolgten alle in feuchten Kammern bei Raumtemperatur (20°C) und in Dunkelheit.

### Histochemische Tetrazolium Methoden

Histochemische Tetrazoliummethoden werden in erster Linie für den Nachweis von Enzymaktivitäten der Dehydrogenasen, Reduktase und Oxidasen *in situ*, in gerierfixiertem Gewebe angewendet. Die enzymkatalytische Oxidation des Substrates setzt Protonen frei, die vom Coenzym aufgenommen werden. Dieses geht dadurch in die reduzierte Form über. Das reduzierte Coenzym wiederum reduziert seinerseits einen Elektronenträger wie zum Beispiel PMS, der seine Elektronen weitergibt auf einen Endakzeptor.

Bei den histochemischen Nachweisen dieser Arbeit handelte es sich in den meisten Fällen um Tetranitroblautetrazolium als Endakzeptor (G6PDH, PGHD, ALDH, NOS in lebenden Makrophagen und „respiratory burst“). Nur bei dem NOS-Nachweis in Gefrierschnitten wurde mit Nitroblautetrazoliumsalz / NBT gearbeitet.

### Histochemische Diazonium Methoden- simultane Azokupplung (Loijda et al., 1976)

Die histochemische Reaktion läuft hierbei in zwei Schritten ab. Als erstes wird das Substrat gespalten (als Substrate dienen Naphtholderivate). Durch die Spaltung wird Naphthol, beziehungsweise Naphthol-AS als erstes Reaktionsprodukt gebildet. Die zweite Reaktion ist eine Fällungsreaktion, wobei das primäre Reaktionsprodukt mit dem Kupplungsreagenz, dem Diazoniumsalz, zu einem wasserunlöslichen Azofarbstoff reagiert (sekundäres Reaktionsprodukt). Nach dem Prinzip der simultanen Azokopplung können Phosphatasen, Glycosidasen, Esterasen und Peptidasen dargestellt werden.

Um das Gewebe zu schützen und eine Auswaschung der Enzyme zu verhindern, wurde mit Medien gearbeitet, deren Grundlage entweder Polyvinylalkohol oder Polypep (ein hochmolekulares Polypeptid) darstellte.

### Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (Van Noorden und Fredericks, 1992)

#### Inkubationsmedium

9 g Polyvinylalkohol wurden unter Erwärmung im Wasserbad in 50 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 7,4) gelöst.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgen die Zugabe von	
500 µl	MgCl <sub>2</sub> (81 mg/ml A. dest.)
500 µl	PMS (15 mg/ml A.dest.)
500 µl	Natriumazid (33 mg/ml A.dest.)
2 ml	Tetranitro BT (250 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml DMSO bei vorsichtiger Erwärmung)
500 µl	Glucose-6-Phosphat (300 mg/ml A. dest.)
500 µl	NADP (63 mg/ml A. dest.)

Die Inkubationsdauer betrug 3 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Reaktion mit auf 60°C erwärmten 0,1 M Phosphatpuffer, pH 5,3 gestoppt, die Schnitte getrocknet und in Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Kontrollinkubationen wurden durchgeführt ohne Substrat und Coenzym.

### Phosphoglyconat-Dehydrogenase (PGDH) (Van Noorden und Fredericks, 1992)

#### Inkubationsmedium

9 g Polyvinylalkohol wurden unter Erwärmung im Wasserbad in 50 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 8,0) gelöst.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgen die Zugabe von	
500 µl	PMS (15 mg/ml A.dest.)
500 µl	Natriumazid (33 mg/ml A.dest.)
2 ml	Tetranitro BT (250 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml DMSO bei vorsichtiger Erwärmung)
500 µl	6-Phosphogluconsäure (303 mg/ml A. dest.)
500 µl	NADP (63 mg/ml A. dest.)

Die Inkubationsdauer betrug 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Reaktion mit auf 60°C erwärmten 0,1 M Phosphatpuffer, pH 5,3 gestoppt, die Schnitte getrocknet und in Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Kontrollinkubationen wurden durchgeführt ohne Substrat und Coenzym.

## Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) (Van Noorden und Fredericks, 1992)

### Inkubationsmedium

9 g Polyvinylalkohol wurden unter Erwärmung im Wasserbad in 50 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 7,0) gelöst.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgen die Zugabe von

500 µl	PMS (15 mg/ml A.dest.)
500 µl	Natriumazid (33 mg/ml A.dest.)
2 ml	Tetranitro BT (250 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml DMSO bei vorsichtiger Erwärmung)
500 µl	Benzaldehyd (2,6 ml/ 10 ml A. dest.)
500 µl	NADP (63 mg/ml A. dest.)

Die Inkubationsdauer betrug 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Reaktion mit auf 60°C erwärmten 0,1 M Phosphatpuffer, pH 5,3 gestoppt, die Schnitte getrocknet und in Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Kontrollinkubationen wurden durchgeführt ohne Substrat und Coenzym.

### Nitrit-Oxid-Synthase (NOS)

Der Nachweis der NOS erfolgte angelehnt an die Methode von Van Noorden und Fredericks, beschrieben in „metabolic mapping“, in Vorbereitung.

Die induzierbare NOS wird hierbei als NADPH-Diaphorase nachgewiesen.

Bevor die Schnitte in das Inkubationsmedium eingesetzt wurden, erfolgte eine 30 minütige Fixierung in 4% gepuffertem Formol (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4). Nachfolgend wurden die Schnitte zweimal in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) gespült und 15 Minuten trocknen gelassen. Es folgte eine Vorinkubation von 30 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,5 mit 0,3 % Triton x versetzt.

### Inkubationsmedium

Zu 4 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 8,5) wurden hinzugegeben:

40 µl	NADPH (84 mg/ml A.dest.)
80 µl	Nitro BT (50 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml DMSO bei vorsichtiger Erwärmung).

Die Inkubationsdauer betrug 90 Minuten. Danach wurde die Reaktion mit auf 60°C erwärmten 0,1 M Phosphatpuffer, pH 5,3 gestoppt, die Schnitte getrocknet und in Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Kontrollinkubationen wurden durchgeführt mit spezifischen Inhibitoren:

Zu 4 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 8,5) wurden hinzugegeben:

40 µl	NADPH (84 mg/ml A.dest.)
80 µl	Nitro BT (50 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml DMSO bei vorsichtiger Erwärmung).
40 µl	Inhibitor

1. Diphenylen Iodonium (0,315 mg/ml A. dest.) = 1 mM
2. N<sup>G</sup>-Methylarginin (25 mg/ml A. dest.) = 5 mM

### Saure Phosphatase (SP)

Die saure Phosphatase spaltet im sauren Milieu die Ester der Orthophosphorsäure, außerdem werden von diesem Enzym Pyrophosphatverbindungen angegriffen. Sein pH- Optimum liegt zwischen 4 und 5. Die saure Phosphatase gilt als ein typisches lysosomales Enzym und als Markerenzym für die Verdauungsaktivität von Makrophagen (Klein, 1991).

Nachzuweisen ist dieses Enzym durch eine Substratinkubation mit anschließender Azokopplung, in diesem Fall an Fast Violett B. Die Bestimmung der lysosomalen Membranstabilität beruht ebenfalls auf dem Nachweis eines lysosomalen Enzyms. Andere Autoren, die den Lysosomenstabilitätstest von Säugetieren auf Muscheln und Fische übertragen haben, setzten als indirekten Nachweis der Membranstabilität die Aktivität des lysosomalen Enzyms N-Acetylhexosamidase ein (Moore, 1980, Köhler et al. 1992, das grundlegende Prinzip dieses Testes wird im Folgenden erläutert). In der vorliegenden Arbeit wurde anstelle der N-Acetylhexosamidase die Saure Phosphatase eingesetzt, die ein Marker für die digestive Aktivität von Makrophagen darstellt. Auf diese Weise war es möglich, mit einer Präparation und einem Reaktionsansatz zwei unterschiedliche Parameter zu untersuchen:

1. Die Abbauaktivität von Makrophagen Aggregaten in der Leber als potentieller Indikator für Immunmodulation.
2. Die Membranstabilität von Lysosomen in Hepatozyten des Lebergewebes als integrativer Parameter der Hepatozytenschädigung. Ein Indikator für nicht spezifische toxische Reaktion.

### Die lysosomale Labilisierungszeit

Die Bestimmung der lysosomalen Labilisierungszeit ist ein Indikator für die Schädigung der Lysosomenmembran. Der lysosomale Stabilitätstest wurde 1973 von Bitensky et al. für Untersuchungen an Säugetieren entwickelt. Das Plymouth Marine Laboratory (Great Britain) wendete diesen Test während der letzten 15 Jahre an marinen Wirbellosen, in der Hauptsache *Mytilus edulis*, erfolgreich an. Es zeigte sich dabei, dass die Stabilität der Lysosomenmembran einen sensiblen Parameter für den Zustand von Zellen der Verdauungsdrüse bei Muscheln und Schnecken darstellt (Moore, 1980, Moore et al., 1984). Toxische Komponenten (Phenanthren, Anthracen, Chlorkohlenwasserstoffe) führten zur Destabilisierung der Membran sekundärer Lysosomen und zur Freisetzung hydrolytischer Enzyme in das Zytoplasma. Köhler (1991) übertrug diesen Test auf Lysosomen von Fischhepatozyten.

### *Testprinzip*

Die Lebergewebeschnitte werden bei diesem Test einem 0.1 M Citratpuffer (pH 4.5) mit 2.5 % NaCl ausgesetzt, der die Lysosomenmembran labilisiert, also durchlässig macht. An diese Behandlung schließt sich eine Anfärbung des lysosomalen Enzyms Saure Phosphatase an. Die Säurebehandlung erhöht die Permeabilität für das später zugefügte Substrat und das Diazoniumsalz. Je stärker die Lysosomen durch biotische und abiotische Streßfaktoren, besonders durch toxische Substanzen oder/und Sauerstoffradikale geschädigt sind, desto kürzere künstliche Destabilisierungsphasen in saurem Puffer sind zur Destabilisierung der Membranen nötig. Dies macht sich bei der lichtmikroskopischen Untersuchung dadurch bemerkbar, dass bereits nur kurz labilisierte Proben (z.B. nach 2 bzw. 4 Minuten Inkubationszeit) sehr intensive Enzymfärbungen zeigen, dass heißt, schon nach kurzer Zeit eine erhöhte Membranpermeabilität erreicht wurde.

Für diesen Test wurden 14 Objektträger á 2 Schnittserien unterschiedlich lange im Schüttelbad bei 37 °C labilisiert. Die Labilisationszeiten betragen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50 Minuten. Nach der Labilisierung wurde das Gewebe ebenfalls bei 37 °C im Schüttelbad mit dem Substrat inkubiert, so dass eine Abspaltung der Naphtholgruppe durch die Aktivität der Sauren Phosphatase stattfinden konnte. Diese Naphtholgruppe stellt das erste Reaktionsprodukt dar.

#### Substratinkubationsmedium:

3.5 g low viscosity polypeptid (Polypep P - 5115, Sigma) gelöst in  
50 ml 0.1 M Citratpuffer (pH 4.5) mit 2.5 % NaCl  
kurz vor Inkubationsbeginn wird hinzugefügt:  
10 mg Naphtol As Bi Phosphat gelöst in  
1 ml DMSO

Anschließend wurde 2 x 3 Minuten in 3 % Na Cl - Lösung gründlich gespült, da es ansonsten zu einer Artefaktbildung zwischen Polypep und Fast Violett hätte kommen können.

Dann erfolgte die Kopplung der Naphtol As Bi- Gruppe an den Diazofarbstoff Fast Violett für 10 Minuten bei 4 °C.

#### Rezept der Färbelösung:

50 mg Fast Violett  
50 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Nach Abgießen der Färbelösung wurde 5 Minuten unter fließendem Wasser gespült, danach 15 Minuten bei 4 °C in Bakers Formol fixiert, mit Aqua. dest. 3 x gespült und in Glyceringelatine eingedeckelt.

Die genaue Beschreibung der Bestimmung der lysosomalen Labilisationszeit erfolgt im Abschnitt Auswertung.

## Die Aktivität der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten

Die Aktivität der SP in MA wurde anhand der Schnitte durchgeführt, die keiner Säuredestabilisierung unterzogen worden sind (0er), bei denen es also weder zu einer Auswaschung des Enzyms durch den Säurepuffer, noch zu einer Destabilisierung nicht-angeschnittener Lysosomen kommen konnte. Die genaue Beschreibung der Bestimmung der SP-Aktivität erfolgt im Abschnitt Auswertung.

## *Histochemische Methoden an lebenden Kopfnierenzellen*

Die Kopfnierenzellen wurden gepoolt nach Geschlechtern und Stationen. Für jeden histochemischen Nachweis wurden vier separate Ansätze hergestellt:

- Enzymnachweis an nicht-stimulierten Zellen.
- Enzymnachweis an stimulierten Zellen.
- Kontrolle an nicht-stimulierten Zellen, ohne Substrat.
- Kontrolle an stimulierten Zellen, ohne Substrat.

Für jeden Ansatz wurden 250 µl Zellen entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt. Zu zwei Ansätzen wurden 25 µl PMA der verdünnten Endlösung gegeben (Endkonzentration 0,01%), um die Makrophagen zu stimulieren (20 Minuten). Zu allen Ansätzen wurde 9 µl SOD gegeben (Endkonzentration 0,1 mM), damit entstehende Sauerstoffradikale abgefangen werden und es zu keinen Überlagerungen der Enzymreaktionen durch ROS bedingte Formazanreduktionen kommen konnte. Die Freisetzung von  $O_2^-$  Anionen ist Superoxid-Dismutase (SOD) sensibel (Di Giulio et al., 1989).

## DiffQuick Färbung

Von allen Ansätzen wurde eine Unterprobe genommen, fixiert in 4% Phosphat gepuffertem Formol (0,1M, pH 7,4), um mit Hilfe einer DiffQuick Färbung eine Identifizierung der Makrophagen und Monozyten in der Kopfnierenzellfraktion durchführen zu können.

## Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)

### Inkubationsmedium

0,1 g Polyvinylalkohol wurden unter Erwärmung im Wasserbad in 5 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 7,4) gelöst.

	Nach Abkühlung auf 37 °C erfolgen die Zugabe von
50 µl	MgCl <sub>2</sub> (81 mg/ml A. dest.)
50 µl	PMS (8 mg/ml A.dest.)
50 µl	Natriumazid (33 mg/ml A.dest.)
200 µl	Tetranitro BT (250 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml DMSO bei vorsichtiger Erwärmung)
20 µl	Glucose-6-Phosphat (300 mg/ml A. dest.)
30 µl	NADP (63 mg/ml A.dest.)

Die Inkubationsdauer betrug 20 Minuten. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1ml 4%igem Formol in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,3). Die Lagerung der Zellen bis zur Auswertung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse erfolgte bei 4°C.

## Phospho-Glyconat-Dehydrogenase (PGDH)

### Inkubationsmedium

0,1 g Polyvinylalkohol wurden unter Erwärmung im Wasserbad in 5 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 8) gelöst.

	Nach Abkühlung auf 37 °C erfolgen die Zugabe von
60 µl	MgCl <sub>2</sub> (81 mg/ml A. dest.)
50 µl	PMS (8 mg/ml A.dest.)
50 µl	Natriumazid (33 mg/ml A.dest.)
200 µl	Tetranitro BT (250 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml DMSO bei vorsichtiger Erwärmung)
20 µl	6-Phosphogluconsäure (303 mg/ml A. dest.)
30 µl	NADP (63 mg/ml A.dest.)

Die Inkubationsdauer betrug 20 Minuten. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1ml 4%igem Formol in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,3). Die Lagerung der Zellen bis zur Auswertung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse erfolgte bei 4°C.

## Saure Phosphatase (SP)

### Inkubationsmedium

0,1 g Polyvinylalkohol und 5mg Fast Violet wurden unter Erwärmung im Wasserbad in 5 ml 0.1 M Acetatpuffer (pH 5) gelöst.

Nach Abkühlung auf 37 °C erfolgen die Zugabe von  
30 µl Naphthol-AS-BI-Phosphat (10 mg/ml DMSO)

Die Inkubationsdauer betrug 20 Minuten. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1ml 4%igem Formol in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,3). Die Lagerung der Zellen bis zur Auswertung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse erfolgte bei 4°C.

## DT-Diaphorase/NOS

Der Nachweis der NOS als DT-Diaphorase erfolgte nach einer 30 minütigen Vorinkubation der Zellen in 4%igem Formol, verdünnt mit Phosphatpuffer (0,1M, pH 8,5). Nach der Vorinkubation wurde die Zellsuspension zentrifugiert und in das Inkubationsmedium eingesetzt.

### Inkubationsmedium

0,1 g Polyvinylalkohol wurden unter Erwärmung im Wasserbad in 5 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 8,5) gelöst.

Nach Abkühlung auf 37 °C erfolgen die Zugabe von  
200 µl Tetranitro BT (250 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml  
DMSO bei vorsichtiger Erwärmung)  
30 µl NADPH (100 mg/ 1,2 ml A.dest.)

Die Inkubationsdauer betrug eine Stunde. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1ml 4%igem Formol in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,3). Die Lagerung der Zellen bis zur Auswertung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse erfolgte bei 4°C.

## Nachweis von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS)

Zur quantitativen Bestimmung der Freisetzung von Sauerstoffradikalen im Verlauf des „respiratory burst“ der Makrophagen wurde ein Ansatz mit SOD vorbehandelt (Kontrolle), ein zweiter nicht (ROS).

### Inkubationsmedium

0,1 g Polyvinylalkohol wurden unter Erwärmung im Wasserbad in 5 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 7,4) gelöst.

Nach Abkühlung auf 37 °C erfolgen die Zugabe von  
200 µl Tetranitro BT (250 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml  
DMSO bei vorsichtiger Erwärmung)



Die Inkubationsdauer betrug 20 Minuten. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1ml 4%igem Formol in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,3). Die Lagerung der Zellen bis zur Auswertung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse erfolgte bei 4°C.

### Aldehyd Dehydrogenase (Benzaldehyd als Substrat)

#### Inkubationsmedium

0,1 g Polyvinylalkohol wurden unter Erwärmung im Wasserbad in 5 ml 0.1 M Phosphat-Puffer (pH 7) gelöst.

Nach Abkühlung auf 37 °C erfolgen die Zugabe von

50 µl PMS (8 mg/ml A.dest.)

50 µl Natriumazid (33 mg/ml A.dest.)

200 µl Tetranitro BT (250 mg gelöst in 1 ml Ethanol abs. und 1 ml DMSO bei vorsichtiger Erwärmung)

30 µl Benzaldehyd (260 µg/ml A.dest.)

30 µl NADP (63 mg/ml A.dest.)

Die Inkubationsdauer betrug 20 Minuten. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1ml 4%igem Formol in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,3). Die Lagerung der Zellen bis zur Auswertung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse erfolgte bei 4°C.

### *Histochemische Methoden an Methacrylatschnitten*

Der Vorteil bei der Einbettung in Methacrylat liegt in der Möglichkeit sehr dünne Schnitte anfertigen zu können (bis 2µm). Die Erhaltung des Gewebes ist durch die Fixierung sehr gut - daher eignet sich die Methodik für histopathologische Untersuchungen. Es hat sich gezeigt, dass auch Enzymnachweise an Methacrylatschnitten möglich sind. Dies betrifft die Enzyme, die in Kompartimenten verschlossen trotz der intensiven Spülungen und Entwässerungsvorgänge nicht ausgewaschen werden können.

### Die Hämatoxylin und Eosin Färbung (H&E)

#### Färbeprinzip

Die H&E - Färbung ist die klassische Färbung für histopathologische Untersuchungen. Mit dem Hämatoxylin werden basophile Zellbestandteile angefärbt, mit dem Eosin saure, bzw. eosinophile Bestandteile. Auf die pathologischen Veränderungen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wird im Abschnitt Auswertung genauer eingegangen. Gefärbt wurde mit Gills Hämatoxylin und mit 0.5 % iger Eosinlösung.

### Färbevorgang

30 min.	Färbung in Gills Hämatoxylin
5 min.	Bläuen in fließendem Leitungswasser
Spülen in Aqua. dest.	
3 min.	Gegenfärben in Eosinlösung
ca. 30 sec.	Auswaschen der überschüssigen Farbe in 70 % igem Alkohol
Eindeckeln in Euparal	

### Rezept Gills Hamatoxylinlösung:

6 g	Hämatoxylin
0.6 g	Natriumiodat
52.8 g	Aluminiumsulfat
690 ml	Aqua. dest.
250 ml	Ethylenglycol
60 ml	Eisessig

Diese Lösung muß vor Gebrauch gefiltert werden.

### Rezept Eosinlösung:

0.5 g	Eosin Y
100 ml	Ethanol (96 %)
2 Tropfen	Eisessig

### Die Färbung für Polkapseln von Myxosporidien-Sporen (Ziehl -Neelsen- Methode)

Mit Hilfe der Ziehl-Neelsen Färbung ist es möglich, Polkapseln von Mikroporidien-Sporen anzufärben, so dass eine Identifizierung dieser Parasiten im Lebergewebe durchgeführt werden kann.

### Färbevorgang

Schnitte in Aqua dest. spülen
In Carbol- Fuchsin bei 56 °C im Wärmeschrank 30 Minuten färben
Differenzieren in saurem Alkohol
Danach gründlich mit Leitungswasser waschen
Gegenfärben in 0,1% Methylenblaulösung, (10-15 sec)
3 x in Aqua. dest. spülen
Trocknen
in Euparal eindeckeln

### Rezept Carbol- Fuchsin

1 g	Alkalisches Fuchsin
0.5 g	Phenol
10 ml	Ethanol (absolut)
100 ml	Aqua. dest.

### Die PAS - Färbung (Perjodsäure - Schiff - Reaktion)

#### Charakterisierung

Mit der PAS - Färbung werden Polysaccharide angefärbt. Makrophagenzentren sind in der Regel PAS - positiv, da durch den Abbau phagozytierter Zellbestandteile in letzter Stufe auch Zucker anfallen, die als Polysaccharide in den Makrophagen gespeichert werden.

#### Färbeprinzip

Die wässrige Lösung von Perjodsäure spaltet besonders in Polysacchariden vorkommende Atomgruppen auf (z. B. die 1,2- Glycolgruppen) und oxidiert diese zu Aldehyden, die dann anschließend mit Schiffschens Reagenz durch Bildung eines roten Farbstoffes nachgewiesen werden können.

Damit es nicht zur Anfärbung anderer Aldehyde kommt, wurden diese durch eine Behandlung mit chloriger Säure blockiert.

#### Färbevorgang

	Aldehydblockade in chloriger Säure über Nacht
10 Minuten	waschen in fließendem Leitungswasser
2 Minuten	in Aqua dest. spülen
10 Minuten	in 1 % iger Perjodsäure
5 Minuten	in Aqua dest. spülen
20 Minuten	in Schiffschens Reagens färben
2 Minuten	in schwefliger Säure bleichen
5 Minuten	in Aqua dest. spülen
15 Minuten	in Gills Hämatoxylin gegenfärben

## **EROD**

Die Präparation der mikrosomalen Fraktion erfolgte nach Andersson et al. (1985). Das Lebergewebe (0,5-0,75 g) wurde in einem Potter-Elvehjem Gefäß mit einem Teflon Homogenisator homogenisiert (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 0,15 M Kaliumchlorid). Die Homogenate wurden bei 10,000 g für 20 Minuten in einer Beckman L2-65B Ultrazentrifuge zentrifugiert, die resultierenden Überstände erneut bei 105,000 g für 60 Minuten. Die Bestimmung der EROD Aktivität erfolgte als Produktion von Resorufin pro Minute nach Burke und Mayer (1974) mit einem Shimadzu RF 5001 PC Spektrofluorimeter. Der Gesamtproteingehalt, sowie der mikrosomale Proteingehalt wurde mit einem Autoanalyseapparat (Technicon, TRAACS 800) nach Lowry (1951) bestimmt, mit Rinderserumalbumin als Standard.

## **Lichtmikroskopische Untersuchungen**

Die Auswertung der angefärbten Methacrylatschnitte und der histochemischen Nachweise der Gefrierschnitte erfolgte mit den Lichtmikroskopen Zeiss Axioskop und Olympus BH 2. An diesen Mikroskopen wurden auch die Fotografien mit digitalen Kameras (AVT CCD schwarzweiß Videokamera, SONY Cyber-shot, 3,3 Mega Pixels) angefertigt.

Die Messungen der Enzymaktivität und die Morphometrie erfolgten interaktiv mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse. Eine mit dem Zeiss Axioskop verbundene Videokamera (Farbe, Sony) wurde über einen Framegrabber (maximale Pixel 786 x 512) mit dem Bildanalysesystem der Firma KONTRON verbunden (Software KS 300). Für die Untersuchungen wurde monochromatisches Licht der Wellenlänge 580 nm genutzt. Die Enzymaktivität wurde als Grauwert (mittlere Absorption) der Reaktionsprodukte (Formazan und Diazo-Farbstoff) gemessen, in den lebenden Einzelmakrophagen der Kopfnieren bei 600facher Vergrößerung, in den Makrophagen Aggregaten der Leber und im Lebergewebe bei 400facher Vergrößerung. Die Einstellung der Kamera sowie ihr Setup wurden den Empfehlungen von Chieco et al. (1994) für enzymhistochemische Auswertungen entnommen.

Die Messung der MA- Größe erfolgte an Gefrierschnitten, die nach der Methode für Saure Phosphatase gefärbt worden waren. Gemessen wurde ebenfalls interaktiv bei 100-, beziehungsweise 400facher Vergrößerung und nach vorheriger geometrischer Kalibrierung des Gerätes. Es wurden pro Tier sechs zufällig über den Schnitt verteilte Bildausschnitte ausgewertet und interaktiv durch Umfahren der Aggregate Größe und Anzahl der MA registriert. Die mittlere Größe der Aggregate wurde in  $\mu\text{m}^2$  angegeben. Einzelmakrophagen wurden hierbei in der ersten Phase der Studie (von 1995 bis 1997) nicht berücksichtigt, da sich die Zellgrenzen der amöboid beweglichen Zellen im Gewebe bei 100facher Vergrößerung lichtmikroskopisch schwer nachvollziehen ließen und der Meßfehler daher zu hoch gewesen wäre.

Lebende Makrophagen aus der Kopfnieren, sowie Makrophagen Aggregate im Salinitätsexperiment, in der Infektionsstudie und in der zweiten Phase der Felduntersuchungen wurden bei 600facher Vergrößerung interaktiv gemessen. Bei diesen Vergrößerungen war es möglich, Einzelzellen zuverlässig zu erfassen. Auch hier erfolgte die Angabe der mittleren Größe in  $\mu\text{m}^2$ .

### **Bestimmung der lysosomalen Labilisationszeit (LL)**

Die Bestimmung der LL erfolgte am Lichtmikroskop anhand der Seriengefrierschnitte bei 400facher Vergrößerung. Die Labilisationszeit ist die Säurebehandlungszeit, die erforderlich ist, um die Membran der Lysosomen zu destabilisieren. Mit Hilfe der histochemischen Anfärbung eines lysosomalen Enzyms kann der Moment des Membranzusammenbruchs indirekt demonstriert werden. Dieser Zeitpunkt der Säuredestabilisierung macht sich durch einen Anstieg der Färbeintensität innerhalb der Lysosomen bemerkbar, da bei steigender Destabilisierung der Membranen das zugesetzte Substrat und der Farbstoff (Fast Violet) in größerer Menge in die Lysosomen eintreten können und es zu einer Anfärbung des primären Reaktionsproduktes kommen kann. Der Zeitpunkt der Destabilisation ist durch die höchste Färbeintensität (peak) gekennzeichnet.

Um den Punkt zu ermitteln, an dem die höchste Färbeintensität herrschte, war es nötig, immer zwei Objektträger parallel auf den Mikroskoptisch zu legen und in aufsteigender Reihe die verschiedenen Labilisationszeiten miteinander zu vergleichen. Es wurde festgestellt, dass nicht alle Lysosomenmembranen gleichzeitig zusammenbrechen. Für unterschiedliche Lysosomenpopulationen gab es unterschiedliche Peaks. In diesem Fall konnten zwei Peaks festgestellt werden (Peak 1 und 2). Vor Vergleich zweier Schnitte wurde mit Hilfe der Mikroskop-Mikrometerschraube die Schnittdicke kontrolliert.

### **Histopathologische Untersuchungen-Diagnostik der Parasiteninfektion**

Die histopathologische Untersuchung des Lebergewebes erfolgte anhand der H&E, PAS und Ziehl-Neelsen gefärbten Methacrylatschnitte bei 400er und 600er Vergrößerung. Für jedes Tier wurde eine allgemeine Beschreibung der histopathologischen Veränderungen angefertigt und danach eine Entwicklung über den Infektionsverlauf beschrieben. Aufgrund dieser Beschreibung wurden die Meeräschen im Mittelmeer in drei Klassen eingeteilt:

- ◆ Nicht infiziert (0)
- ◆ Infiziert mit diffusen Infiltrationen (1)
- ◆ Infiziert mit Plasmodienbildung und Sporogenese (2)

Außerdem wurden mehrere histopathologische Parameter ausgewählt (Nekrosen, Vakuolisierung der Hepatozyten, PAS-positive Einschlüsse, Infiltrationen/ unspezifische Entzündungen und Gallengangsproliferationen), deren Auftreten semiquantitativ bewertet wurde, um so einen eventuellen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Makrophagenzentren und/oder der anthropogenen Belastung des Lebensraumes und dem Auftreten spezieller histopathologischer Veränderungen registrieren zu können.

### **Schadstoffanalytik**

Die Rückstandsanalytischen Untersuchungen an Muskel- und Lebergewebe der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fische, wurden von zwei kommerziellen Laboratorien durchgeführt, die regelmäßig an Interkalibrierungsmaßnahmen teilnehmen (Institut für Fischqualität, Prof. Dr. Harz Bremerhaven, Handels- und Umweltschutzlaboratorium Dr. Wierz, Hamburg).

Untersucht wurden folgende Rückstandskonzentrationen:

- Blei, Cadmium, Quecksilber, Kupfer, Nickel, Zink, Mangan, Eisen, Aluminium.
- HCB,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, p,p-DDE, p,p-DDD, p,p-DDT, o,p-DDE, o,p-DDD, o,p-DDT, OCS, Dieldrin, PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 und 180.

### **Statistik**

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden ausschließlich nicht parametrische verteilungsfreie Verfahren angewendet, da die Daten zu einem Großteil nicht normal verteilt waren.

Die Absicherung signifikanter Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuchstagen des Salinitätsexperimentes, beziehungsweise zwischen den einzelnen Stationen der Feldstudien erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Testes, wenn es sich um 3 oder mehr Versuchsgruppen gehandelt hat. Dieser Test stellt eine Verallgemeinerung des U-Testes dar. Die Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 5\%$ , bei zweiseitigem Test, als signifikant angesehen. Dennoch sind alle ermittelten Irrtumswahrscheinlichkeiten an den jeweiligen Stellen angegeben. Bei einem Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test angewendet. Wo Signifikanz zwischen den einzelnen Versuchstagen, beziehungsweise Stationen auftrat, wurde der multiple post hoc Test nach Nemenyi für gleich- bzw. ungleich besetzte Stichproben angewendet, um herauszufinden, zwischen welchen Tagen, beziehungsweise zwischen welchen Stationen die signifikanten Unterschiede bestanden (Sachs, 1978). Um Zusammenhänge zwischen den einzelnen untersuchten Parametern zu ermitteln wurde die Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Statistika Programmes, beziehungsweise mit Excel (Mittelwertberechnungen der Rohdaten).

In jedem Kapitel werden die angewendeten Methoden kurz aufgezählt und auf den speziellen Abschnitt in diesem Material und Methoden Teil hingewiesen. Die angewendeten multivariaten Methoden werden in Kapitel 4 (integrierte Analyse) beschrieben.

# Kapitel 1

## **Funktionsanalysen an lebenden Makrophagen aus der Kopfniere von männlichen und weiblichen Flundern aus unterschiedlich stark belasteten Gebieten der Deutschen Bucht**

### *Einleitung*

Die Fähigkeit von Makrophagen zu phagozytieren und potentielle Pathogene wie Bakterien und Parasiten zu töten und zu verdauen beruht auf der Wirkung verschiedener Enzyme. Jedes dieser Enzyme ist verantwortlich für einen einzigen Schritt in einem komplizierten Prozess mit dem Ziel, die Gesundheit des Organismus aufrecht zu erhalten. Die Aktivität bestimmter Enzyme spielt bei der Erreichung des Zieles eine fundamentale Rolle. In der folgenden Studie stand die Frage im Vordergrund, inwieweit anthropogene Belastung, unter realen Feldbedingungen Auswirkungen auf die Aktivität bestimmter „Schlüsselenzyme“ von Makrophagen aus der Kopfniere von Flundern hat.

Eine Schlüsselfunktion des Phagozytose-Prozesses ist die Erzeugung reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROS) zur Abtötung der Pathogene. Die Freisetzung von ROS ist der Endpunkt einer Kaskade von Enzymreaktionen. Voraussetzung dafür ist die Induktion der NADPH-Oxidase. Die Menge freigesetzter Sauerstoffradikale ist ein Meßparameter für Immunmodulation und die Suppression der ROS-Erzeugung im Zusammenhang mit anthropogener Belastung ist für eine Reihe von Schadstoffen und Fischarten dokumentiert (Dunier und Siwicki, 1993). In der vorliegenden Studie wurde der Frage nachgegangen, ob eventuell bereits zu einem früheren Zeitpunkt in der ROS-Kaskade, nämlich bei der Bereitstellung von NADPH, dem Substrat für die NADPH-Oxidase ein Effekt durch Schadstoffeinfluss festzustellen ist.

NADPH wird von den Zellen im Pentose-Phosphat-Zyklus (s. Einleitung) durch Reduktion von NADP erzeugt, bevor es der NADPH Oxidase als Substrat zur Verfügung gestellt werden kann. Schlüsselenzym dieses Vorgangs ist die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH), von der Aktivitätsveränderungen unter Schadstoffeinfluß in Hepatozyten und Makrophagen von Fischen beschrieben worden sind (Winzer et al., 2001, Baier und Baier-Anderson, 2000). Ein weiteres Enzym das im Pentose Phosphat Zyklus für die NADPH Erzeugung zuständig ist, ist die Phosphogluconat Dehydrogenase (PGDH). Auch für dieses Enzym sind Aktivitätsveränderungen im Zusammenhang mit schadstoffinduzierter Tumorgenese beschrieben worden (Köhler und Van Noorden, 1998).

Die zweite Schlüsselfunktion, auf die sich diese Studie konzentriert, ist die Aktivität des lysosomalen Enzyms Saure Phosphatase als ein Indikator für die lysosomale digestive Abbaukapazität von Makrophagen. Die Frage war, ob sich Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen Flundern aus der belasteten und Flundern aus der gering belasteten Station erkennen lassen.

Ein weiteres Enzym, dessen Aktivität in den Makrophagen-Primärzellkulturen ermittelt wurde ist die Aldehyd Dehydrogenase (ALDH). Dieses Enzym, dessen Aktivität über die Ah Genbatterie reguliert wird (Nebert et al., 1990, Celander, 1993), entgiftet toxische Aldehyde, die durch die Wirkung von Sauerstoffradikalen auf die Membranen der Makrophagen entstehen und stellt damit eine wichtige Schutzfunktion für diese ROS produzierenden Leukozyten dar.

Die Enzymaktivitäten wurden zum Einen in ruhenden, nicht stimulierten Makrophagen der Kopfniere, zum Anderen in mit Phorbolmyristateter (PMA) stimulierten Zellen durchgeführt. Die Stimulierung führt zu einer Veränderung des Makrophagenstoffwechsels- der Makrophage geht in einen aktivierten Zustand über, in einen Zustand erhöhter

Phagozytoseaktivität (Klein, 1991). Damit verbunden ist außerdem unter anderem die Erzeugung von ROS und reaktiven Stickstoffmetaboliten (NOS) (siehe generelle Einleitung).

### *Material und Methoden*

Die Enzymaktivität wurde histochemisch in lebenden Makrophagen der Kopfniere männlicher und weiblicher Flundern ermittelt. Die Fische wurden auf einer hoch belasteten Station (Elbemündung) und einer gering belasteten Station (Tiefe Rinne vor Helgoland) gefangen. Parallel dazu wurden von einer anderen Arbeitsgruppe die Erzeugung von ROS in nicht stimulierten und stimulierten Makrophagen gemessen. Zur Bestimmung der Schadstoffbelastung der untersuchten Fische wurden rückstandsanalytische Messungen im Muskelgewebe der Flundern durchgeführt. Gemessen wurde die Konzentration von Standard-Organochlorverbindungen und Schwermetallen (Genereller Methodenteil).

Die Zellen von den weiblichen und männlichen Flundern wurden für jede Station jeweils gepooled, um ausreichend Makrophagen für alle Enzymreaktionen zu erhalten.

#### Stimulierung und histochemische Enzymreaktionen

Für jede Station wurden pro Geschlecht 12 Ansätze a 250 µl Zellsuspension vorbereitet. Vor der histochemischen Enzymreaktion wurden die Ansätze, bis auf den Ansatz zur ROS-Bestimmung mit Superoxidismutase (Konzentration 0,1 mM) vorinkubiert, um freigesetzte Superoxid-Anionen zu reduzieren, damit diese das in der Enzymfärbung eingesetzte Tetranitroblautetrazoliumsalz nicht zu Formazan umwandeln und damit Artefakte schaffen. Zur selben Zeit wurde zu einer Hälfte der Ansätze PMA (Konzentration 0,01%) gegeben, um die Makrophagen zu stimulieren. Nach einer halben Stunde der PMA-Inkubation erfolgte die jeweilige Enzymfärbung (Genereller Methodenteil).

#### Auswertung

Die Auswertung der Enzymaktivität erfolgte am Lichtmikroskop bei 600facher Vergrößerung interaktiv mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse. Es wurden mindestens 50 Zellen pro Ansatz gemessen. Die Messung erfolgt in monochromatischem Licht der Wellenlänge 580nm für alle Enzymreaktionen mit Tetranitroblautetrazolium. Die ermittelten Absorbtionswerte wurden dann mit Hilfe des Gesetzes nach Lambert-Beer in Enzymaktivitätswerte umgerechnet.

$$A = \varepsilon \times c \times d$$

A=Absorbtion,  $\varepsilon$ = Extinktionskoeffizient von Formazan (19000, Van Noorden und Fredericks, 1992), d= Durchmesser der Makrophagen (siehe Abschnitt Zellgröße-für jede Gruppe wurde der mittlere Durchmesser der Makrophagen bestimmt und in die Berechnung eingesetzt). Ein Molekül Formazan wird gebildet durch die Umsetzung von zwei Substratmolekülen.

Für die Saure Phosphatase war eine Umrechnung nicht möglich, da das Färbeprinzip auf einer anderen Grundlage (simultane Azokopplung) beruhte.

Die Zellgröße wurde ebenfalls mit der Bildanalyse bei 600facher Vergrößerung bestimmt.



## Ergebnisse

Die Zellen wurden in folgende acht Gruppen aufgeteilt:

Weibchen Elbe	1
Weibchen Elbe/ stimuliert	2
Männchen Elbe	3
Männchen Elbe/stimuliert	4
Weibchen Tiefe Rinne	5
Weibchen Tiefe Rinne/stimuliert	6
Männchen Tiefe Rinne	7
Männchen Tiefe Rinne/stimuliert	8

### Generelle Belastungssituation

Die Belastungssituation der untersuchten Flundern stellte sich wie folgt dar (Abb. 1.1):

Für fast alle chlororganischen Schadstoffe zeigte sich ein einheitliches Bild. Die Flundern aus der Elbmündung waren signifikant höher belastet, als die in der Tiefen Rinne gefangenen Fische. Für einige Stoffe, die ein hohes immunmodulatorisches Potential haben, wie PCB 52 und PCB 101 (s. Kapitel 3) konnte gezeigt werden, dass die Rückstände in Fischen der Tiefen Rinne so gering waren, dass sie unter der Nachweisgrenze lagen. Dies stand im Gegensatz zu den Elbeflundern, die eine Belastung mit diesen Komponenten im Muskelgewebe aufwiesen. Das selbe gilt für Hexachlorbenzol (HCB), einem typischen "Elbeschadstoff", sowie Octachlorstyrol, einem Nebenprodukt der Kunststoffindustrie (De Jong et al., 1999).

Für einen Stoff zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Die Konzentration des HCH-Isomeres  $\gamma$ -HCH, auch bekannt als Lindan, war in Flundern aus der Tiefen Rinne signifikant höher, als in Flundern aus dem Elbeästuar.

Die Belastung männlicher und weiblicher Fische war für alle Schadstoffe auf beiden Stationen vergleichbar. Es gab keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Belastungssituation.

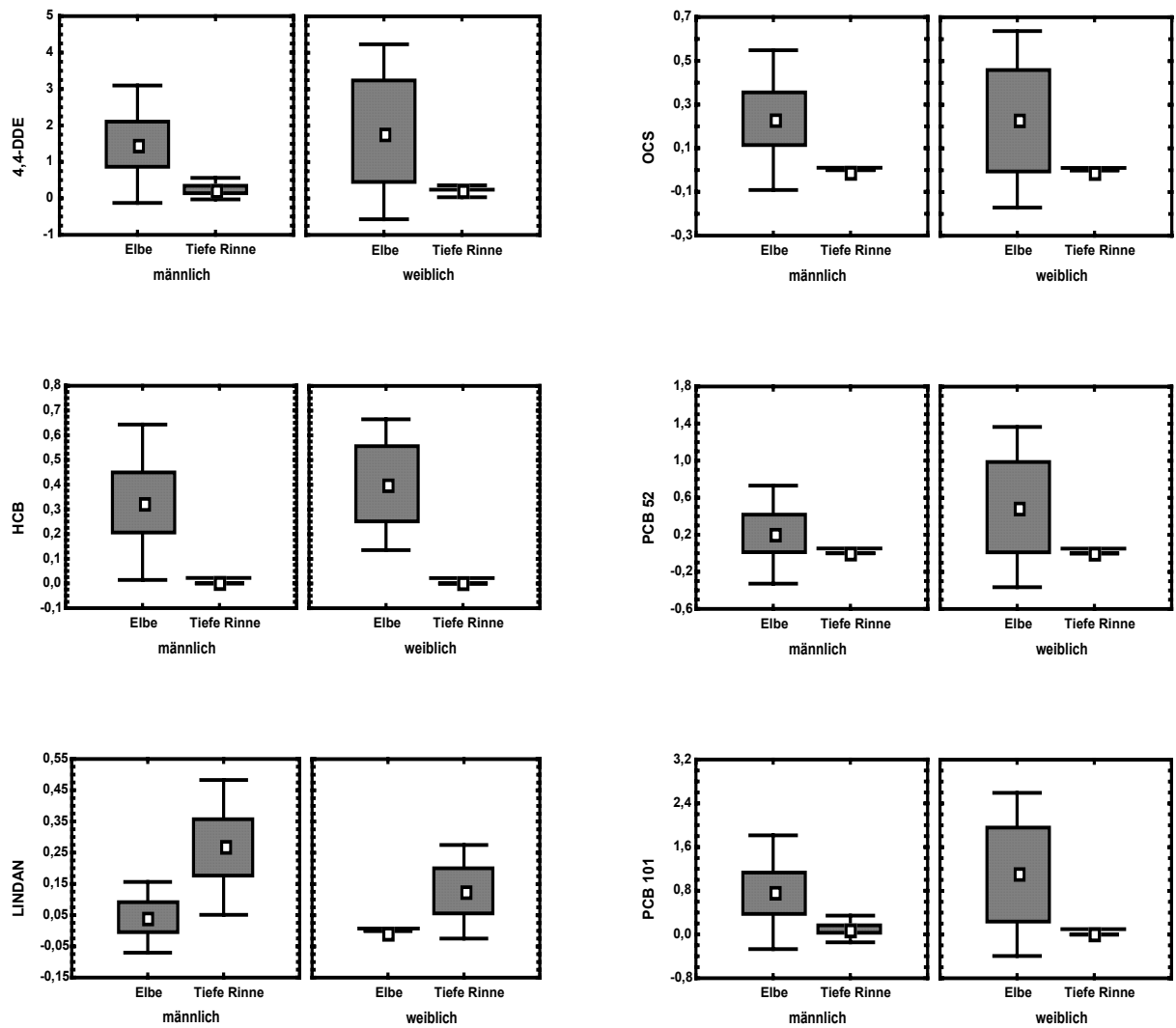


Abb. 1.1: Rückstandsanalytische Messungen in den untersuchten männlichen und weiblichen Flundern aus zwei unterschiedlich stark belasteten Gebieten der Deutschen Bucht, Werte sind angegeben in  $\mu\text{g/kg}$  Frischgewicht, Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n=20$ .

## Zellgröße

Der mittlere Durchmesser nicht stimulierter Makrophagen aus der Kopfniere von Flundern lag bei 14,2  $\mu\text{m}$ . Zwischen den Geschlechtern und den Untersuchungsgebieten konnten in Bezug auf die Größe der Makrophagen im nicht-stimulierten Zustand keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. In Folge der Stimulierung mit PMA kam es in allen untersuchten Gruppen zu einer Vergrößerung der untersuchten Makrophagen auf durchschnittlich 23,7  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Neben dem Durchmesser vergrößerte sich auch der Umfang der Zellen.

Während die Vergrößerung der stimulierten Makrophagen gegenüber den nicht stimulierten Ruhestadien in männlichen Flundern aus Elbe und Tiefer Rinne, sowie in weiblichen Flundern aus der Tiefen Rinne statistisch signifikant war, war dies in weiblichen Fischen aus der stark belasteten Elbemündung nicht der Fall. Der mittlere Durchmesser der Zellen lag in dieser Gruppe bei 17,1  $\mu\text{m}$ .

Stimulierte Makrophagen weiblicher Flundern haben im belasteten Elbeästuar im Mittel einen signifikant geringeren Durchmesser, als ihre Geschlechtsgenossinnen im gering belasteten Gebiet der Tiefen Rinne (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,001$ , Abb. 1.2).

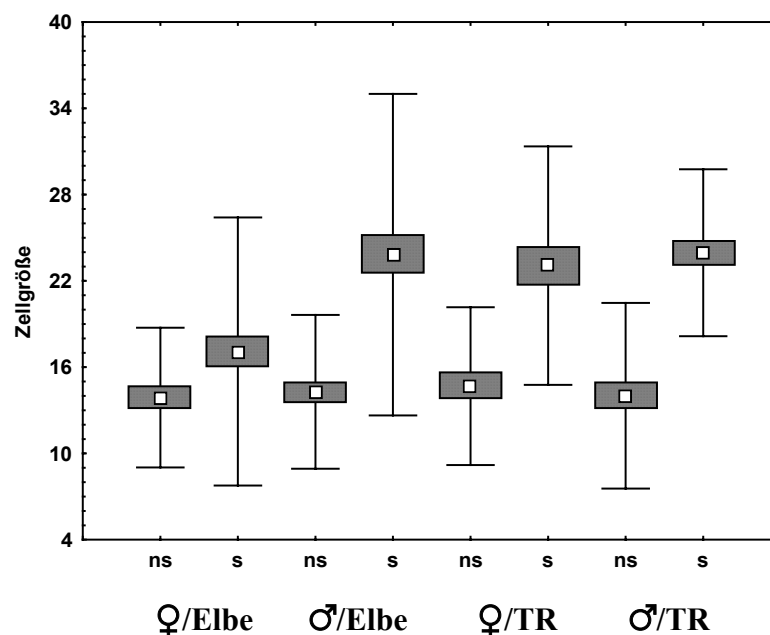


Abb. 1.2: Zellgröße (Durchmesser in  $\mu\text{m}$ ) lebender Makrophagen ( $n \geq 50$ ) aus der Kopfniere männlicher und weiblicher Flundern von zwei unterschiedlich stark kontaminierten Stationen in der Deutschen Bucht (TR/Tiefe Rinne=Referenz, Elbe=belastet, ns= nicht stimuliert, s= stimuliert. Mittelwerte und Standardabweichungen).

## Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH)

Bei der G6PDH wurde in den nicht-stimulierten Zellen weiblicher Elbe Flundern eine signifikante höhere Aktivität ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis-Test, Abb. 1.3) als in den anderen nicht stimulierten Gruppen ermittelt. Nach der Stimulierung kam es in diesen Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung der G6PDH Aktivität gegenüber den nicht stimulierten Zellen, nicht aber in den weiblichen Flundern aus der Elbe. Diese zeigten zwar eine Erhöhung der Aktivität, die aber nicht statistisch signifikant war.

Vergleicht man die G6PDH Aktivität in stimulierten Makrophagen weiblicher Flundern zwischen der belasteten Elbe Station und dem Referenzgebiet Tiefe Rinne, so zeigte sich eine signifikant niedrigere Enzymaktivität ( $p < 0,0001$ ) in den Flundern aus der Elbe. In männlichen Fischen gab es dagegen keine signifikanten Unterschiede in der G6PDH Aktivität zwischen den Stationen.

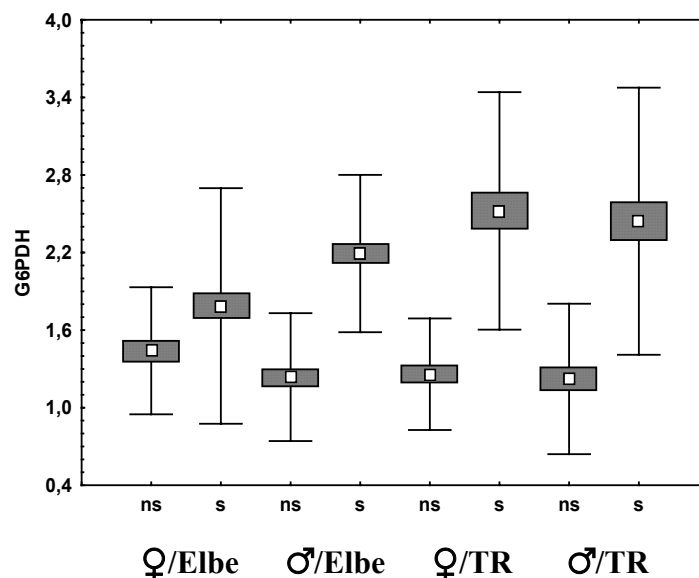


Abb. 1.3: Aktivität der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase ( $\mu\text{g G6P/ml/min}$ ) in lebenden Makrophagen männlicher und weiblicher Flundern von zwei unterschiedlich stark kontaminierten Stationen in der Deutschen Bucht (TR/Tiefe Rinne=Referenz, Elbe=belastet, ns= nicht stimuliert, s= stimuliert. Mittelwerte und Standardabweichungen).

## Phosphogluconat Dehydrogenase (PGDH)

Bei der PGDH zeigte sich eine signifikant höhere Enzymaktivität in nicht stimulierten Makrophagen der männlichen und der weiblichen Flundern aus der Elbe, verglichen mit ihren jeweiligen Geschlechtsgenossen aus der Tiefen Rinne ( $p < 0,0001$ ). Nach der Stimulierung wurde bei allen Gruppen eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität gemessen, die jedoch stärker war in den Fischen aus der Tiefen Rinne. Der Unterschied zwischen der Aktivität stimulierter Makrophagen beider Stationen war bei den männlichen Fischen signifikant ( $p < 0,05$ ), bei den weiblichen Fischen nicht (Abb. 1.4).

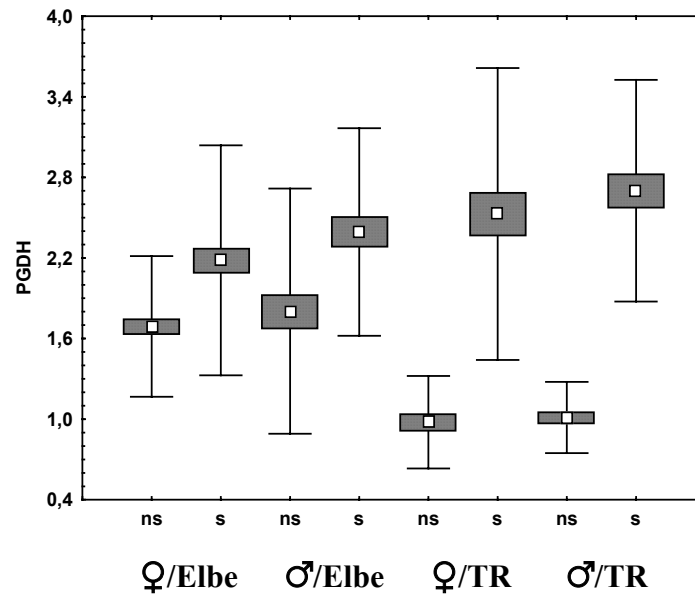


Abb. 1.4.: Aktivität der Phosphogluconat Dehydrogenase ( $\mu\text{gPG/ml/min}$ ) in lebenden Makrophagen männlicher und weiblicher Flundern von zwei unterschiedlich stark kontaminierten Stationen in der Deutschen Bucht (TR/Tiefe Rinne=Referenz, Elbe=belastet, ns= nicht stimuliert, s= stimuliert. Mittelwerte und Standardabweichungen).

#### Saure Phosphatase (SP)

Im Gegensatz zu den anderen Enzymen führte bei der Sauren Phosphatase eine Stimulierung mit PMA nicht zu einer Erhöhung der Enzymaktivität. Es konnten in keiner Gruppe statistisch signifikante Unterschiede der Enzymaktivität zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen gemessen werden. Im Gegensatz dazu konnten sowohl bei den Männchen, als auch bei den Weibchen signifikant niedrigere Enzymaktivitäten in Fischen von der belasteten, verglichen mit Fischen aus der gering belasteten Station festgestellt werden (Abb. 1.5). Diese Tatsache macht die Saure Phosphatase besonders interessant für den Einsatz in Freilanduntersuchungen, da hier ohne vorherige Stimulierung der Makrophagen eine Immunmodulation erkennbar war. Das bedeutet, dass in Bezug auf dieses Enzym auch in situ Untersuchungen möglich sind und nicht mit lebenden Zellen gearbeitet werden muss, die noch stimuliert werden müssen, um Unterschiede in der Immunantwort bestimmen zu können. Diese Ergebnisse, gemeinsam mit den Ergebnissen vorhergehender Untersuchungen am Steinbutt, bei denen eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Intensität des „respiratory burst“ und der Aktivität der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten der Steinbuttleber gefunden wurde, geben Anlass zu der Annahme, dass die Aktivität der Sauren Phosphatase als ein Parameter für die Untersuchung von Umwelteinflüssen auf das unspezifische Immunsystem von Fischen eingesetzt werden kann.

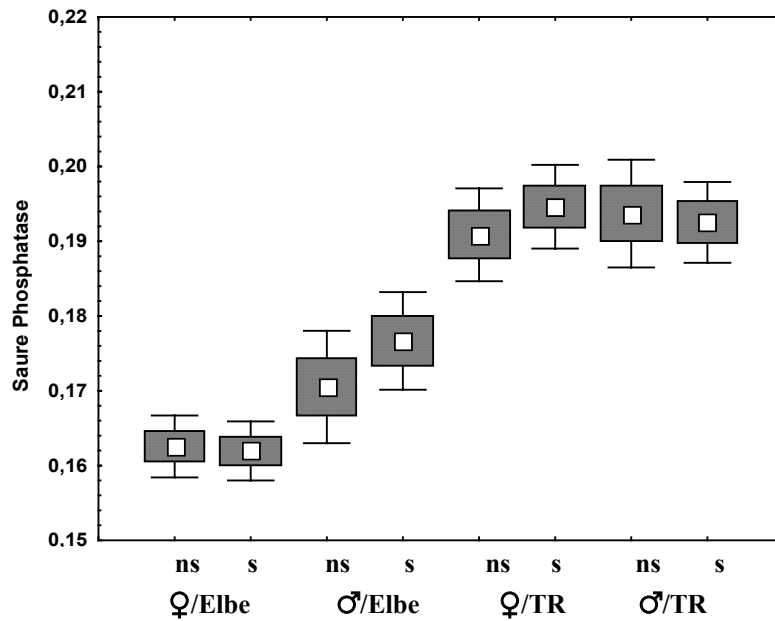


Abb. 1.5.: Aktivität der Sauren Phosphatase in lebenden Makrophagen männlicher und weiblicher Flundern von zwei unterschiedlich stark kontaminierten Stationen in der Deutschen Bucht (TR/ Tiefe Rinne=Referenz, Elbe=belastet, ns= nicht stimuliert, s= stimuliert).

#### Aldehyd Dehydrogenase mit Benzaldehyd als Substrat (ALDHbenz)

In der Grundaktivität der Makrophagen, das im unstimulierten Zustand, gab es weder stations- noch geschlechtsspezifische Unterschiede in der ALDH-Aktivität, die statistisch signifikant waren. Nach Stimulierung mit PMA stieg die Aktivität in den Makrophagen aller Gruppen, bis auf die Weibchen aus der Elbe signifikant (Elbe Männchen  $p < 0,05$ , Tiefe Rinne Weibchen und Männchen  $p < 0,0001$ ), wobei die Steigerung in den Fischen aus dem Referenzgebiet Tiefe Rinne signifikant höher war, als in den Elbe Fischen (Weibchen  $p < 0,0001$ , Männchen  $p < 0,05$ ) (Abb. 1.6).

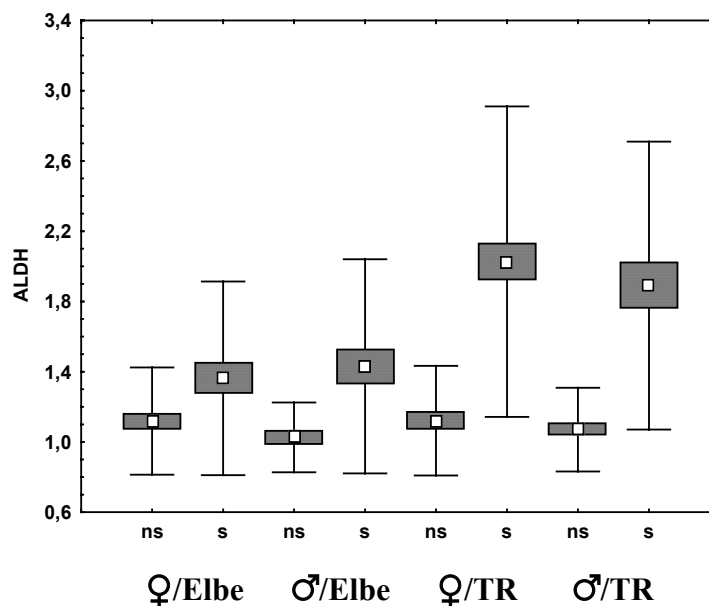


Abb. 1.6.: Aktivität der ALDH ( $\mu\text{g}$  Benzaldehyd/ml/min) in Makrophagen männlicher und weiblicher Flundern von zwei unterschiedlich stark kontaminierten Stationen in der Deutschen Bucht (TR/Tiefe Rinne=Referenz, Elbe=belastet, ns= nicht stimuliert, s= stimuliert. Mittelwerte und Standardabweichungen).

#### DT-Diaphorase/ iNOS und reaktive Sauerstoffmetabolite (ROS)

Für die Bestimmung der DT-Diaphorase als Marker für iNOS-Aktivität, sowie für die Bestimmung der Freisetzung radikaler Sauerstoffmetabolite während des „respiratory burst“ in Makrophagen, erfolgte die Auswertung durch Auszählen der positiven Zellen pro Messbereich (512x512), da die Aktivität beider Systeme zu einer totalen Schwarzfärbung der Zellen führte. Dadurch war eine quantitative Analyse der Enzymaktivität mit der computergesteuerten Bildauswertung unmöglich. Insgesamt wurden 10 Messbereiche ausgezählt und daraus Mittelwerte berechnet.

#### *DT-Diaphorase/ NOS*

In den nicht stimulierten weiblichen Fischen aus der Elbe wurden nur ganz vereinzelt positive Zellen gefunden (im Mittel 2 Zellen pro 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension).

Eine Stimulierung der Zellen mit PMA führte nicht zu einer Zunahme der positiven Zellzahlen.

In den nicht stimulierten Zellen der männlichen Elbflundern wurden zwischen 10 und 20 positive Zellen pro 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension gezählt (im Mittel 16). Auch bei diesen Fischen führte eine Stimulierung mit PMA nicht zu einer Zunahme der positiven Zellen.

Bei den weiblichen Fischen aus der Tiefen Rinne waren mehr als 30 Zellen pro 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension positiv. Auch in diesem Fall führte eine Stimulierung mit PMA nicht zu einer Erhöhung der positiven Zellzahlen.

Bei den männlichen Flundern aus der Tiefen Rinne konnten im Schnitt 24 positive Zellen pro 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension gezählt werden. Nach Stimulierung mit PMA stieg die Zahl auf 29.

„respiratory burst“/ reaktive Sauerstoffmetabolite (ROS)

Die Auswertung des „respiratory burst“ erfolgte fotografisch. Insgesamt wurden pro Geschlecht, Station und Behandlung 10 Messbereiche ausgewertet und Mittelwerte, sowie Standardabweichungen berechnet. Im Folgenden werden die Unterschiede in der Erzeugung von Sauerstoffradikalen zwischen männlichen und weiblichen Fischen aus Elbe und Tiefer Rinne demonstriert (Abb. 1.7).

Sowohl in den männlichen, als auch in den weiblichen Flundern waren nach Stimulation mit PMA auf der gering belasteten Station Tiefer Rinne erheblich mehr Zellen ROS-positiv, als auf der Station im Elbeästuar (Abb. 1.8). Im Gegensatz dazu zeigten Flundern beiderlei Geschlechts aus dem Elbeästuar durchschnittlich mehr ROS-positive Zellen pro Messbereich, ohne dass vorher eine Stimulierung der Kopfnierenzellsuspension stattgefunden hatte.

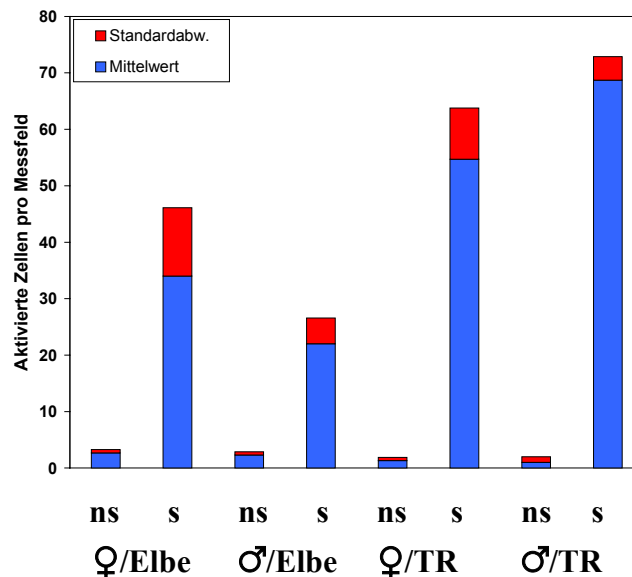


Abb. 1.7: Mittlere Anzahl von ROS-positiven Zellen in der Kopfnierenzellsuspension von Flundern aus Elbeästuar und Tiefer Rinne (TR).



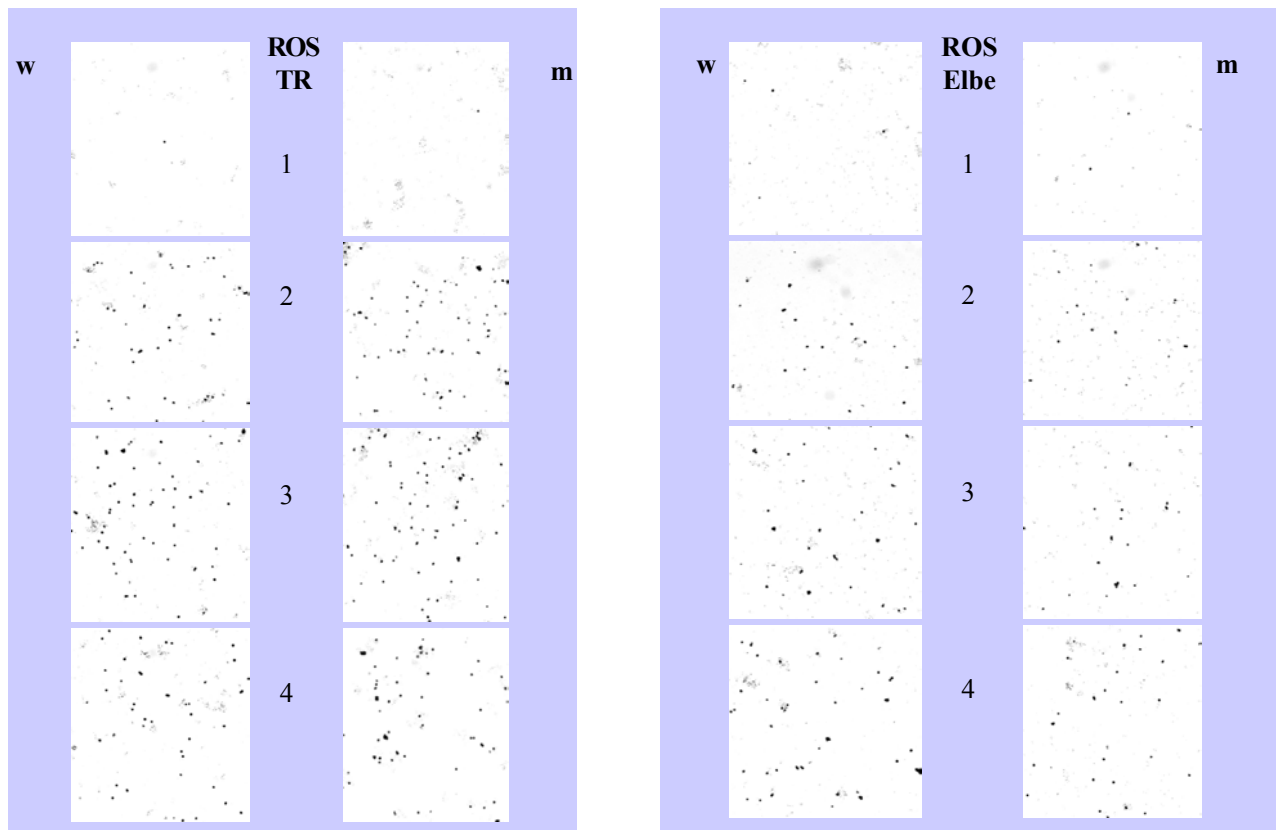


Abb. 1.8.: ROS-Nachweis in nicht stimulierten (1) und stimulierten (2-4) Kopfnieren-Zellsuspensionen von weiblichen (w) und männlichen (m) Flundern aus der Elbemündung und der Tiefen Rinne (TR).

## *Schlussfolgerung*

Die Belastung der Küstengewässer- eine chemische Attacke auf die Fischgesundheit?

Diese Frage ist nicht leicht zu beantworten. Neben einer deutlichen Suppression der Aktivität der NADPH-erzeugenden Enzyme G6PDH und PGDH in stimulierten Makrophagen, vor allem in den weiblichen Fischen von der belasteten Station, wurde für diese Flundern eine erhöhte Aktivität in nicht-stimulierten Zellen gemessen. Das bedeutet, dass die NADPH-Erzeugung vor einer Stimulierung in diesen Flundern aus dem kontaminierten Elbeästuar bereits angeregt war. Besonders auffällig war die hohe Aktivität der PGDH in nicht-stimulierten Makrophagen beider Geschlechter auf der belasteten Station. Potentiellen Eindringlingen gegenüber mag das von Vorteil sein, da diese bereits im Moment der Invasion von den „vorstimulierten“ Makrophagen angegriffen werden können. Ob dies allerdings reicht, um die herabgesetzte Enzymaktivität nach der Stimulierung zu kompensieren, ist fraglich. Dieser Frage wird in Kapitel 5 weiter nachgegangen.

Im Gegensatz dazu zeigte die Saure Phosphatase sowohl in nicht-stimulierten, als auch in stimulierten Makrophagen in Flundern aus dem belasteten Gebiet eine herabgesetzte Enzymaktivität. Diese war in weiblichen Flundern aus der Elbe am niedrigsten, sogar noch einmal signifikant niedriger, als in den männlichen Fischen aus der selben Region.

Alle Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die Konzentrationen von Schadstoffen, denen die Flundern im Elbeästuar ausgesetzt sind, eine deutliche Immunmodulation in Makrophagen verursachen. Diese Veränderungen betreffen sowohl die Erzeugung von NADPH über den Pentosephosphatweg, als auch die Aktivität des lysosomalen Verdauungsenzyms Saure Phosphatase, wobei weibliche Flundern stärker betroffen sind, als ihre männlichen Artgenossen, mit Ausnahme der ROS-positiven Zellzahlen nach Stimulierung mit PMA. Hier zeigten sich in den männlichen Fischen die größten Unterschiede zwischen der belasteten und der gering belasteten Station.

## Kapitel 2

### Salinitätsexperiment

#### *Einleitung*

Die hydrografischen Verhältnisse in der Deutschen Bucht sind außerordentlichen Schwankungen unterworfen. Als Mündungsgebiet mehrerer großer Flüsse, wie der Elbe, der Weser und der Eider, sind es insbesondere Salinitätsschwankungen aufgrund des Süßwassereintrages, die von den Bewohnern der Ästuarbereiche toleriert werden müssen. Die im Fall der vorliegenden Arbeit untersuchte Plattfischart *Platichthys flesus* ist ein euryhaliner Fisch, der seine Verbreitung von rein marinen Gebieten bis hin in den Süßwasserbereich findet. Dies ist ein Grund, aus dem sich die Flunder gut für das integrierte Küstenzonen Management in der Nordsee eignet und bereits in zahlreichen Untersuchungen als Indikatororganismus eingesetzt worden ist. Deutlich wurde in diesen Untersuchungen, dass die am höchsten anthropogen belasteten Mündungsgebiete auch die Meeresbereiche mit der niedrigsten Salinität und den ausgeprägtesten Salinitätsschwankungen sind. Die Referenzgebiete hingegen sind in der Regel marin, das heißt mit einer gleichbleibenden Salinität von über 30‰, da es in der Deutschen Bucht keine als gering belastet eingeschätzten Ästuargebiete gibt, die als Referenz zu den belasteten Flussmündungen genutzt werden könnten (De Jong et al., 1999). Die Untersuchung von Referenzgebieten, parallel zu belasteten Stationen ist nötig, um unabhängig von saisonalen Einflüssen die Ergebnisse aus kontaminierten Gebieten mit denen nicht kontaminierter Gebiete (Referenz) vergleichen zu können. Da aber in der Deutschen Bucht kein Ästuar als gering belastet eingestuft werden kann, wurde in Untersuchungen oft auf die Untersuchungen von Fischen aus dem marinen Bereich zurückgegriffen, die wesentlich geringerem Schadstoffeinfluß ausgesetzt sind (Broeg et al., 1999, 2002). Die Salinität stellt somit insbesondere in der Deutschen Bucht, aber auch in der Ostsee einen wichtigen abiotischen Faktor dar, von dem ein Parameter, der biologische Effekte aufgrund von Schadstoffeinfluss reflektiert, möglichst unabhängig sein sollte.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß von Salinitätsveränderungen auf die Aktivität der Sauren Phosphatase und die Größe von Makrophagen Aggregaten, aber auch auf andere Biomarker wie die lysosomale Membranstabilität und die CYP1A1 EROD Aktivität untersucht. Diese Biomarker reflektieren Effekte auf subzellulärer und zellulärer Ebene und sind eng in den Metabolismus der Fische eingebunden. Eine Modulation der Biomarkerantwort durch Salinitätsschwankungen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen der EROD Aktivität in Flundern zeigte eine Induktion dieses Enzyms in Ästuaren mit hoher anthropogener Belastung. In diesen Gebieten kam es ebenfalls zu einer Erniedrigung der Lysosomenstabilität und zu einer Herabsetzung der MA Aktivität in der Leber (Broeg et al., 1999). Ziel dieser Studie war es nun zu klären, ob alleine eine Erniedrigung des Salzgehaltes von 36‰ auf 15‰, wie im Mittel in den Ästuaren gemessen, zu einer Veränderung der Biomarkerantwort führen würde.

## Material und Methoden

### Fische und Hälterung

Die für diese Versuche getesteten Flundern (*Platichthys flesus*) wurden im April 2000 in der Deutschen Bucht vor Helgoland (Tiefe Rinne) gefangen und in den Seewasserkreislauf der Biologischen Anstalt Helgoland in Hamburg eingesetzt. Insgesamt 300 Fische wurden auf 8 Rundbecken mit einem Durchmesser von 100 cm verteilt. Die Tiefe betrug 60 cm, die Salinität zwischen 35‰ und 36‰. In den Becken herrschten permanenter Wasserdurchfluß und Belüftung. Die Wasseraustauschrate lag bei ca. einem Beckenvolumen pro Stunde. Die Größenklasse der Flundern entsprach dem für die Freilanduntersuchungen festgelegten Bereich zwischen 18 und 25 cm.

Die physikalischen und chemischen Daten waren während der gesamten Hälterungsdauer wie folgt:

Salzgehalt	35.6 - 35.8 ‰
Temperatur	15 °C
Gesamtammonium	< 0.15 mg / l
Nitrit	< 0.5 mg / l
Nitrat	< 100 mg / l

Fütterung : gefrorene *Mytilus edulis* bis zur Sättigung pro Becken und Tag. Die Flundern blieben 2 Monate im Kreislauf, um sich zu akklimatisieren, bevor der Versuch begann.

### Experiment

Bei Beginn des Experiments waren noch 160 Flundern ohne äußerlich erkennbare Krankheits- und Verletzungszeichen vorhanden. Alle Fische die äußerliche Schäden zeigten, wurden nicht mit in den Versuch einbezogen. Die Flundern wurden gleichmäßig auf die 8 Becken aufgeteilt, so dass sich insgesamt 20 Fische ein Becken teilten.

Bei Beginn des Versuches wurde die Salinität von 4 Becken innerhalb von 6 Stunden von 36‰ auf 15‰ gesenkt. In den anderen 4 Becken blieb der Salzgehalt bei 36‰. Am Tag nach der Umstellung fand die erste Probennahme statt. Die weiteren Probennahmen erfolgten nach 3 Tagen, 1 Woche, 2 Wochen und 1 Monat. Die Salinität wurde täglich überwacht.

Ziel war es, sowohl akute Änderungen, als auch längerfristige Effekte einer niedrigen Salinität auf die Biomarkerantworten in dieser euryhalinen Fischart zu erfassen zu können.

Mit Versuchsbeginn wurden jeweils 10 Flundern aus beiden Salinitäten geschlachtet und präpariert. Im Verlauf des Experimentes fungierten Fische, die unter nicht veränderten Salzgehaltsbedingungen weiter gehalten wurden an den jeweils folgenden Entnahmetagen als Kontrollgruppe.

## Entnahmeprotokoll

Versuchstag/ Versuchsgruppe	1/ 1	3/ 2	7/ 3	14/ 4	28/ 5
36‰ (n)	10	10	8	8	5
15‰ (n)	10	10	8	8	8

## Präparation

Die Präparation erfolgte, wie im generellen Methodenteil für die Freilanduntersuchungen beschrieben. Im einzelnen wurden die Flundern gemessen und gewogen, danach wurden die Ektoparasiten abgesammelt und Blut abgenommen, bevor der Fisch mit Genickschnitt getötet und enthauptet wurde. Nach Öffnung der Bauchhöhle durch einen Einschnitt in den Exkretionsporus, der im Kreis bis zu den Kiemen geführt wurde, erfolgte die Präparation der Leber, der Milz und des hinteren Teiles der Niere. Wichtig war hierbei, eine Verletzung der Gallenblase zu vermeiden, da es durch austretende Gallenflüssigkeit zur Herabsetzung der Enzymaktivität hätte kommen können.

Ein zentrales Stück der Leber wurde für die Bestimmung der Lysosomenstabilität und für die Aktivitäts- und Größenbestimmung der Makrophagen Aggregate in flüssigem Stickstoff eingefroren. Außerdem wurde Lebergewebe für die Bestimmung der EROD-Aktivität ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Weitere Proben für Biomarkerbestimmung am gleichen Individuum wurden für die TU-Berlin (Acetylcholinesterase-Hemmung, DNA-unwinding) entnommen.

## Methoden

- ◆ Saure Phosphatase in MA (Genereller Methodenteil)
- ◆ Mittlere Größe der MA (Genereller Methodenteil)
- ◆ Lysosomenstabilitätstest (Genereller Methodenteil)
- ◆ EROD Aktivität (Genereller Methodenteil)

## Ergebnisse

Bei der Stabilität lysosomaler Membranen und der Aktivität der CYP1A1 konnten über den gesamten Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den Salinitätsgruppen festgestellt werden (Abb. 2.2, 2.3). Es kam während der gesamten Dauer weder zu einer signifikanten Herabsetzung der Lysosomenstabilität, noch zu einer Induzierung der EROD-Aktivität. Die durchschnittliche Größe der Makrophagen Aggregate in der Leber der Fische veränderte sich ebenfalls nicht mit Herabsetzung der Salinität und blieb während des ganzen Experimentes konstant (Abb. 2.4).

Der einzige Parameter, bei dem es kurzfristig zu einer Veränderung nach Änderung der Salinität kam, war die Aktivität der Sauren Phosphatase in den Makrophagen Aggregaten der Leber. Am dritten Tag nach der Salinitätsänderung wurden in den bei 15‰ gehälterten Flundern signifikant höhere MA-SP Aktivitäten gemessen, als in den Fischen, die weiter bei 36‰ gehältert wurden (Abb. 2.5). Dieser Unterschied war bei der Beprobung eine Woche nach der Salinitätsänderung nicht mehr vorhanden. Ab diesem Zeitpunkt hatte sich die Aktivität der Sauren Phosphatase in beiden Gruppen wieder angenähert.

Während des Versuchsverlaufes wurde eine kontinuierliche Steigerung der Aktivität der Sauren Phosphatase mit der Dauer des Versuches festgestellt. Diese Aktivitätssteigerung betraf alle gehälterten Flundern, sowohl in 15‰, als auch in 36‰ und steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer Lymphozystisinfektion, die die Fische im Verlauf des Versuches beeinträchtigte und die sich, wie durch die oben genannten Ergebnisse deutlich wurde, eventuell auch auf die nicht-spezifische Immunantwort in der Leber der Fische auswirkte.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass es im Verlauf dieser Infektion nicht zu Unterschieden in der Sauren Phosphatase Aktivität zwischen den beiden Salinitäten kam.

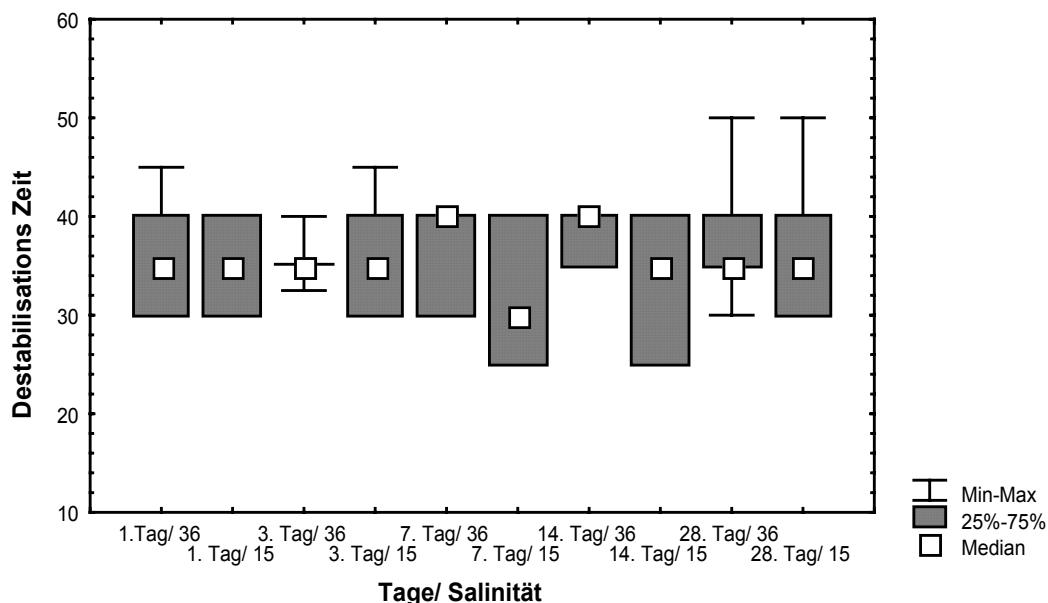


Abb. 2.2: Lysosomenstabilität (2. peak) in der Flunderleber über den Versuchszeitraum von 28 Tagen bei unterschiedlichen Salinitäten (15‰, 36‰).

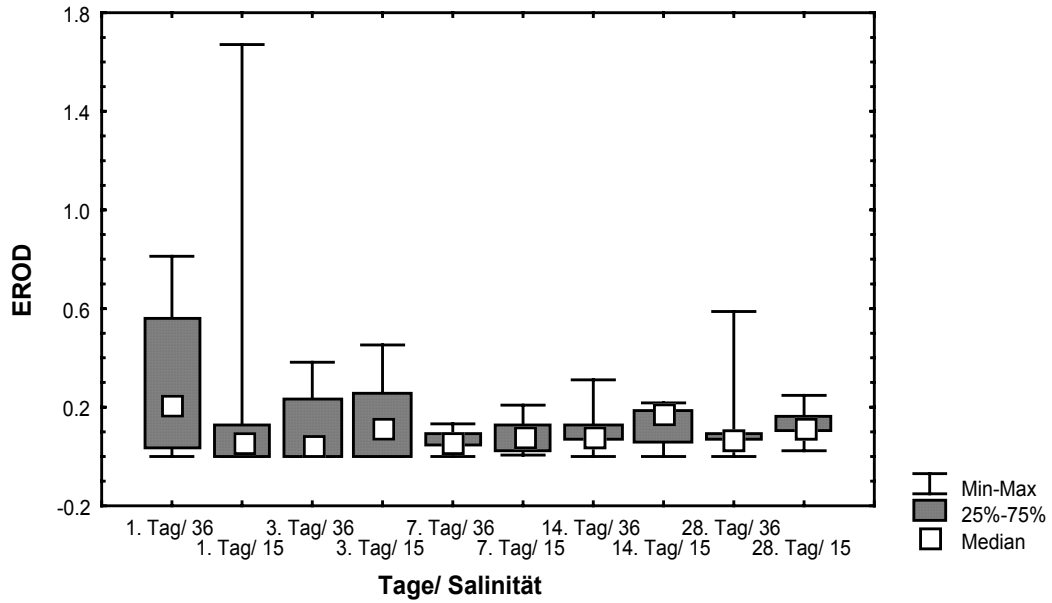


Abb. 2.3: EROD Aktivität (nmol/mg Prot./Min.) in der Flunderleber über den Versuchszeitraum von 28 Tagen bei unterschiedlichen Salinitäten (15‰, 36‰).

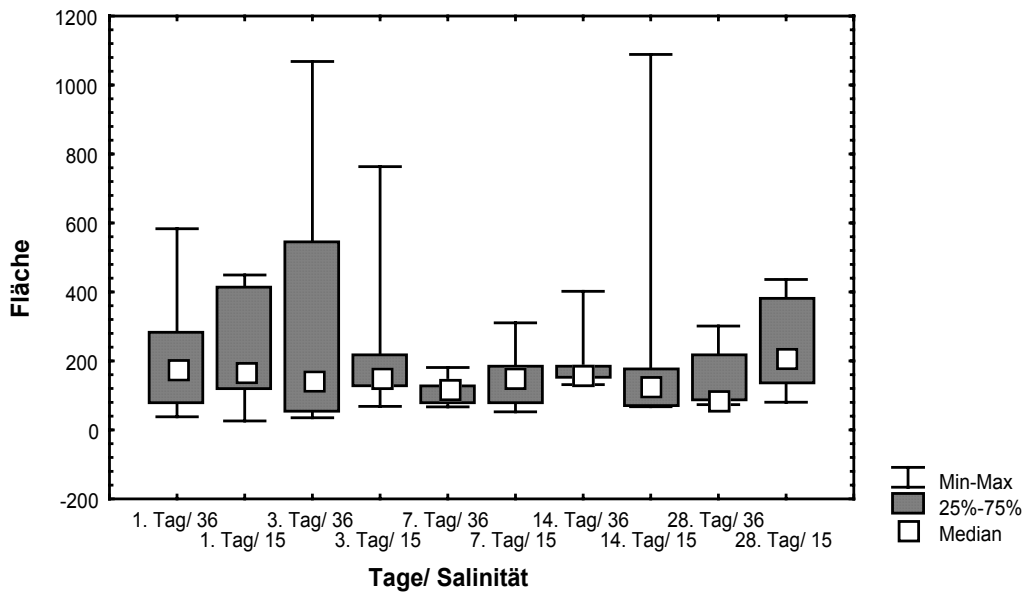


Abb. 2.4: Mittlere Größe (µm<sup>2</sup>) von Makrophagen Aggregaten in der Flunderleber über den Versuchszeitraum von 28 Tagen bei unterschiedlichen Salinitäten (15‰, 36‰).

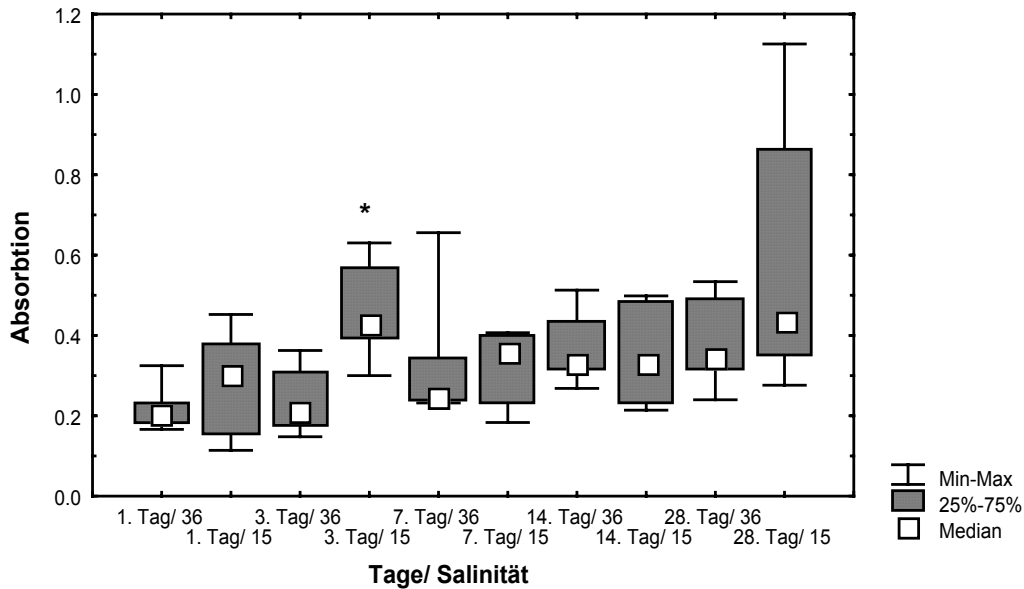


Abb. 2.5: Aktivität der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten in der Flunderleber über den Versuchszeitraum von 28 Tagen bei unterschiedlichen Salinitäten (15‰, 36‰). Die Unterschiede zwischen den Salinitäten sind am dritten Tag nach der Umstellung signifikant (\*), (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ ).

### Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass es der euryhalinen Species *Platichthys flesus* möglich ist, Veränderungen des Salzgehaltes ohne grundlegende Effekte auf die untersuchten Biomarker CYP1A1 EROD und lysosomale Membranstabilität zu tolerieren.

Interessant dabei war, dass es für beide Enzymsysteme, sowohl CYP1A1, als auch die Saure Phosphatase in Makrophagen Aggregaten nach der Umsetzung zu einer Erhöhung der Variabilität zwischen den einzelnen untersuchten Individuen kam. Ein Phänomen, dass auch bei chemischer Belastung des Lebensraumes zu beobachten ist. Die Toleranz gegenüber Stresssituationen scheint individuell sehr unterschiedlich zu sein.

Bei der Aktivität der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten kam es am dritten Tag nach der Umsetzung von 36‰ in 15‰ außerdem zu einer signifikanten Erhöhung der Enzymaktivität, die allerdings bei der nächsten Beprobung nach einer Woche nicht mehr vorhanden war. Dies deutet auf eine Stress-induzierte Aktivitätssteigerung durch das abrupte Absinken des Salzgehaltes hin. Es muß also demzufolge in Ästuarbereichen mit wechselnden Salinitäten mit einer Erhöhung der Sauren Phosphatase Aktivität, verglichen mit den marinen Referenzstationen gerechnet werden. In den belasteten Ästuarbereichen zum Beispiel der Elbe ist aber genau das Gegenteil der Fall: Die Enzymaktivität ist herabgesetzt (Kapitel 1, Kapitel 3, Broeg et al, 1999).

Zieht man auf diesen Stationen eine Erhöhung der Aktivität durch Salinitätsveränderung mit in Betracht, dann ist die Suppression der Enzymaktivität durch Schadstoffe größer, als ermittelt, da sie durch die Induktion durch die Salzgehaltsveränderung eventuell teilweise kompensiert wird.



## Kapitel 3

### Funktionen der Makrophagen Aggregate als Marker für Immunmodulation im integrierten biologischen Effektmonitoring- Nordsee

#### Einleitung

##### Integriertes Biologisches Effektmonitoring

Die Entwicklung zuverlässiger und reproduzierbarer Testverfahren für biologische Parameter zur Beurteilung von anthropogen verursachten Veränderungen mariner Ökosysteme ist die Grundlage für ein sinnvolles Monitoring biologischer Effekte im Meeres- und Küstenbereich. Die Untersuchung einzelner Parameter kann hierbei nur eine unzulängliche Darstellung des Zustandes eines komplexen Organismus bieten. Selbst wenn es gelingt, eine Anzahl verschiedener physiologischer Parameter zu berücksichtigen, bleibt eine Aussage über die Folgen für den Gesamtorganismus und die Population spekulativ (Attril und Depledge 1997). Dennoch, bzw. gerade deshalb ist es nötig, an der Entwicklung und Verbesserung von Messparametern zu arbeiten, die in der Lage sein können, einen Einblick in den momentanen gesundheitlichen Status eines Meeresorganismus zu gewähren.

Um Effekte zu detektieren, die Aussagen über die toxischen Folgen auf unterschiedlichen Ebenen der biologischen Organisation zulassen, wurden verschiedene molekulare und zelluläre Testparameter angewendet:

- Auf der molekularen Ebene wurde die Aktivität des Cytochrom P 450- abhängigen Biotransformationssystems in Hepatozyten untersucht. Mit Hilfe des Enzyms EROD (Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase) (CYP1A1) werden lipophile Schadstoffe in reaktivere Metabolite umgewandelt, um in einer weiteren Phase die Ausscheidung dieser Metabolite möglich zu machen. Im Verlauf dieses Prozesses werden auch Radikale gebildet, die ihrerseits eine schädigende Wirkung auf verschiedene Zellstrukturen ausüben können (DNA-, und Membranschädigungen). Das System ist durch spezifische planare organische Schadstoffe wie Polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und coplanare Polychlorierte Biphenyle (PCBs) induzierbar und wird aus diesem Grund im biologischen Effektmonitoring als Marker für Exposition eingesetzt (Stegeman und Hahn 1994, Goksoyr et al., 1996, Bucheli und Fent, 1995). Die Aktivierung der CYP1A1 läuft über den Aryl Hydrocarbon Rezeptor (AhR). Ein Zusammenhang zwischen dessen Aktivierung und der Modulation der Immunantwort wird gegenwärtig diskutiert (Reiners et al., 1998, Baier-Anderson et al., 2000, Xiang und Rice, 2000, Broeg et al., 2002, eingereicht).
- Auf der zellulären Ebene wurde die Integrität der Membranen des lysosomal-vakuolären Systems durch die Prüfung der Lysosomenmembranstabilität in Fischleberzellen untersucht (Köhler, 1991, Köhler et al., 1992, Köhler et al., 2002). Dieses System ist verantwortlich für den Abbau von Makromolekülen, die als Abfallstoffe des Zellstoffwechsels anfallen, aber auch von anderem Material exogenen Ursprungs, wie organischen Schadstoffen und Schwermetallen. Verschiedene Xenobiotika sind bekannt dafür, Veränderungen der Membraneigenschaften von Lysosomen zu verursachen. Die Schadstoffwirkung verursacht direkt oder indirekt über die Lipidperoxidation durch radikale Metabolite eine Herabsetzung der Membranstabilität und/oder Lysosomenswellungen. Membrandestabilisierung kann zu einem Austreten lysosomaler Enzyme in das Cytoplasma führen und dadurch eine massive Zellschädigung verursachen, die zum Zelltod führen kann. Wir messen die Membranstabilität als Dauer einer Säurebehandlung, die nötig ist, um einen Zusammenbruch der lysosomalen Membran zu

verursachen. Der Zeitpunkt des Membranzusammenbruchs wird als maximale Färbeintensität der Sauren Phosphatase in den Lysosomen mit Hilfe einer automatischen Bildanalyse bestimmt. Die Stabilität lysosomaler Membranen ist somit ein integrativer, nicht spezifischer Marker für toxische Effekte.

- Auf der Ebene des Organs wurde der Gehalt an Neutrallipiden in der Fischleber untersucht. In Lebern des Glycogen-speichernden Typs deutet eine extensive Einlagerung von Fett in den Hepatozyten auf eine pathologische Veränderung des Fettstoffwechsels durch den Einfluß von Xenobiotika hin (Couch 1975). In der weiteren Folge führt ein hoher Fettgehalt in der Leber zu einer vermehrten Einlagerung lipophiler Schadstoffe in dieses Organ. Auch dieser Parameter ist ein Marker für nicht spezifische toxische Reaktion, wird allerdings insbesondere durch chlororganische Verbindungen hervorgerufen.
- Auf der individuellen Ebene wurde die Aktivität des unspezifischen Immunsystems in der Leber über die Messung der Sauren Phosphatase Aktivität in Makrophagenaggregaten bestimmt. Immunotoxizität, verursacht durch den Einfluß anthropogener Chemikalien, ist ein bekanntes toxikologisches Phänomen. Fische könnten hierbei als wichtige Indikatoren für die Belastung von Gewässern dienen, aber Daten über die Auswirkung von sublethalen chronischen Belastungen auf die Fischgesundheit und das Immunsystem sind nur im geringen Umfang vorhanden. Makrophagen sind phagozytotisch aktive Zellen des Immunsystems und spielen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Gesundheit, weil sie die erste Verteidigungslinie im Kampf gegen Pathogene bilden. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Belastung mit bestimmten Chemikalien, wie chlorierten und aromatischen Kohlenwasserstoffen und Tributylzinn eine Herabsetzung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen zur Folge haben (Dunier and Siwicki, 1993, Roszell and Anderson, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die Aktivität der Sauren Phosphatase in Lysosomen von Makrophagen Aggregaten und die Lysosomenstabilität in der Leber kombiniert zu messen. Eine Verbindung dieser beiden Tests erlaubt die gleichzeitige Untersuchung pathologischer und immunologischer Parameter. Im Folgenden wurde die Anwendbarkeit dieser Methode im Rahmen eines integrierten biologischen Effektmonitorings untersucht, sowie der Einfluß von biotischen (Geschlecht, Länge, Laichreife), und abiotischen Faktoren (Jahreszeit/Temperatur, Schadstoffeinfluss) unter Feldbedingungen überprüft.

Auf der Ebene der Biozönose untersuchten die Arbeitsgruppe von Prof. Körting, Hannover und unsere israelischen Kollegen, Prof. Paperna und Dr. Diamant die Artendiversität von Parasiten, die den Lebensraum Fisch bewohnen, um festzustellen, inwieweit sich die anthropogene Belastung auf die Artenvielfalt und verschiedene andere parasitologische Parameter auswirken würde.

In Ergänzung zu den biologischen Untersuchungen wurden stichprobenweise Untersuchungen zur Schadstoffkonzentration in den Fischen und im Sediment durchgeführt.

# Biomarker Kaskade

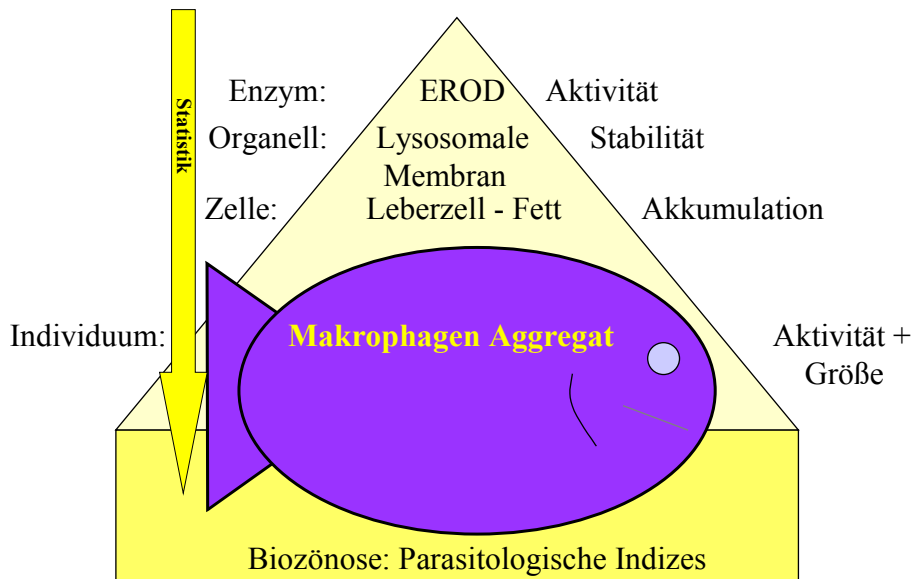


Abb. 3.1: Testverfahren des integrierten Biomarker Ansatzes

## Ergebnisse

### *Größe und Enzymaktivität der Sauren Phosphatase (SP) in Makrophagen Aggregaten -Natürliche Variabilität-*

Über einen Zeitraum von 5 Jahren wurden in der Nordsee insgesamt 968 Fische im Rahmen des oben beschriebenen integrierten Ansatz des biologischen Effektmonitorings untersucht. Die Aktivität der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten ist ein Parameter, der bereits in vorherigen Experimenten seine Eignung gezeigt hat, immunmodulatorische Effekte zu reflektieren (Kapitel 1 und 2). Daher wurde dieser histochemische Ansatz im Rahmen der Untersuchungen mit aufgenommen, um seine Eignung als Biomarker in Felduntersuchungen in Kombination mit bereits validierten Biomarkern zu überprüfen.

### Abhängigkeit der MA-SP und -Größe vom Geschlecht und der Laichreife der untersuchten Flundern

Die Untersuchung von über 700 individuellen Flundern beiderlei Geschlechtes ergab außerhalb der Reproduktionszeiten eine höhere Aktivität der Sauren Phosphatase in weiblichen, verglichen mit den männlichen Flundern (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,05$ ). Aus diesem Grund wurden im Folgenden bei der Auswertung der Feldstudien männliche und weibliche Flundern getrennt betrachtet. In den juvenilen Flundern lag die Aktivität der Sauren Phosphatase noch einmal signifikant über den mittleren Aktivitäten von weiblichen und männlichen Flundern (Abb. 3.2). In juvenilen Flundern wurde eine mehr als doppelt so hohe Saure Phosphatase Aktivität gemessen als in geschlechtsreifen männlichen und weiblichen Flundern.

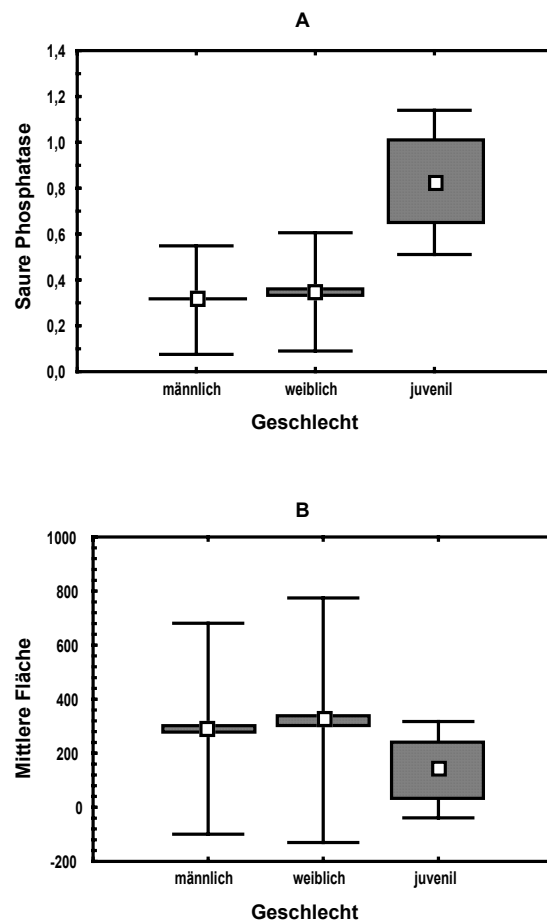


Abb. 3.2.: Makrophagenaggregate in der Leber der Flunder: Aktivität der Sauren Phosphatase (A) und mittlere Größe (Fläche) der MA (B) in Abhängigkeit vom Geschlecht. Mittelwerte und Standardabweichungen.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen der im Mittelmeer untersuchten Mugiliden (siehe Kapitel 4). Die Größe der Makrophagen Aggregate zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Flundern, war allerdings in juvenilen Flundern signifikant niedriger, als in ausgewachsenen männlichen und weiblichen Flundern. Die Aggregate waren in den juvenilen Fischen um circa die Hälfte kleiner, als in den adulten Flundern.

Verglichen mit den nicht laichreifen Geschlechtsgenossinnen wurde in laichreifen weiblichen Flundern eine signifikant niedrigere Saure Phosphatase Aktivität und eine signifikant niedrigere mittlere Größe der Makrophagen Aggregate gemessen (Abb. 3.3).

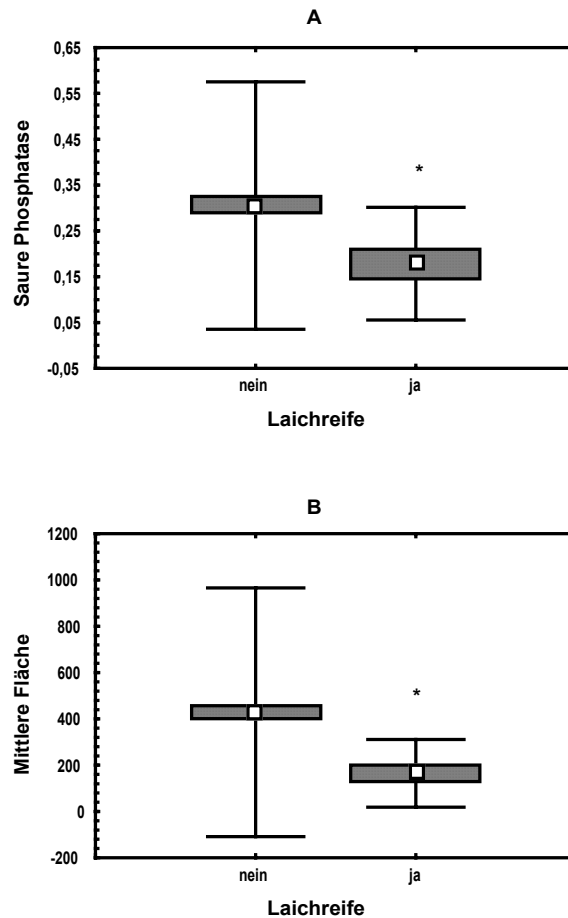


Abb. 3.3.: Makrophagenaggregate in der Leber der Flunder: Aktivität der Sauren Phosphatase (A) und mittlere Größe (Fläche) der Makrophagen Aggregate (B) in Abhängigkeit von der Laichreife (voll ausgereiftes Gonaden-Stadium) in weiblichen Flundern. Mittelwerte und Standardabweichungen.

Bei den männlichen Flundern lag die Aktivität der Sauren Phosphatase in den laichreifen Fischen etwas höher, als in den nicht laichreifen Geschlechtsgenossen. Die Größe der Makrophagen Aggregate war etwas kleiner, wobei diese Unterschiede nicht statistisch signifikant waren.

#### Abhängigkeit der MA-SP und -Größe von der Länge der untersuchten Flundern

Bei den männlichen Flundern wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Länge der untersuchten Fische und der Aktivität der Sauren Phosphatase auch innerhalb der definierten Längensklasse zwischen 18 cm und 25 cm ermittelt (Pearsons-Produkt-Moment- Korrelation,  $p < 0,005$ ). Alle anderen untersuchten Biomarker zeigten innerhalb dieser Längensklasse keine Abhängigkeit (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Korrelationen für männliche Flundern.

Markierte Korr. signifikant für  $p < .05000$   
 N=523 (Fallweiser Ausschluß von MD)

	EROD	Länge	MA Größe	MA-SP	LYS1	LYS2
EROD	1.00	-.00	.03	-.06	<b>-.15</b>	<b>-.14</b>
Länge	-.00	1.00	.03	<b>.15</b>	-.05	.01
MA Größe	.03	.03	1.00	<b>.31</b>	.03	-.02
MA SP	-.06	<b>.15</b>	<b>.31</b>	1.00	<b>.12</b>	<b>.13</b>
LYS1	<b>-.15</b>	-.05	.03	<b>.12</b>	1.00	<b>.75</b>
LYS2	<b>-.14</b>	.01	-.02	<b>.13</b>	<b>.75</b>	1.00

Bei den weiblichen Flundern zeigte sich ein anderes Bild. Hier konnte keine Korrelation zwischen den Makrophagenaggregatparametern und der Länge der Flundern ermittelt werden, aber auch kein Zusammenhang mit den anderen untersuchten Biomarkern, was bei den männlichen Flundern der Fall war (Tab. 3.2).

Tab. 3.2.: Korrelationen für weibliche Flundern.

Markierte Korr. signifikant für  $p < .05000$   
 N=400 (Fallweiser Ausschluß von MD)

	EROD	Länge	MA-Größe	MA-SP	LYS1	LYS2
EROD	1.00	-.03	.00	.01	<b>-.13</b>	<b>-.15</b>
Länge	-.03	1.00	.08	.03	-.04	-.00
MA-Größe	.00	.08	1.00	<b>.34</b>	-.01	-.05
MA-SP	.01	.03	<b>.34</b>	1.00	-.01	.04
LYS1	<b>-.13</b>	-.04	-.01	-.01	1.00	<b>.73</b>
LYS2	<b>-.15</b>	-.00	-.05	.04	<b>.73</b>	1.00

#### Abhängigkeit der MA-SP und -Größe von saisonalen Schwankungen

Der Verlauf der MA-SP Aktivität in der Flunderleber zeigte folgende Ergebnisse über den gesamten Untersuchungszeitraum auf allen beprobten Stationen (Abb. 3.4):

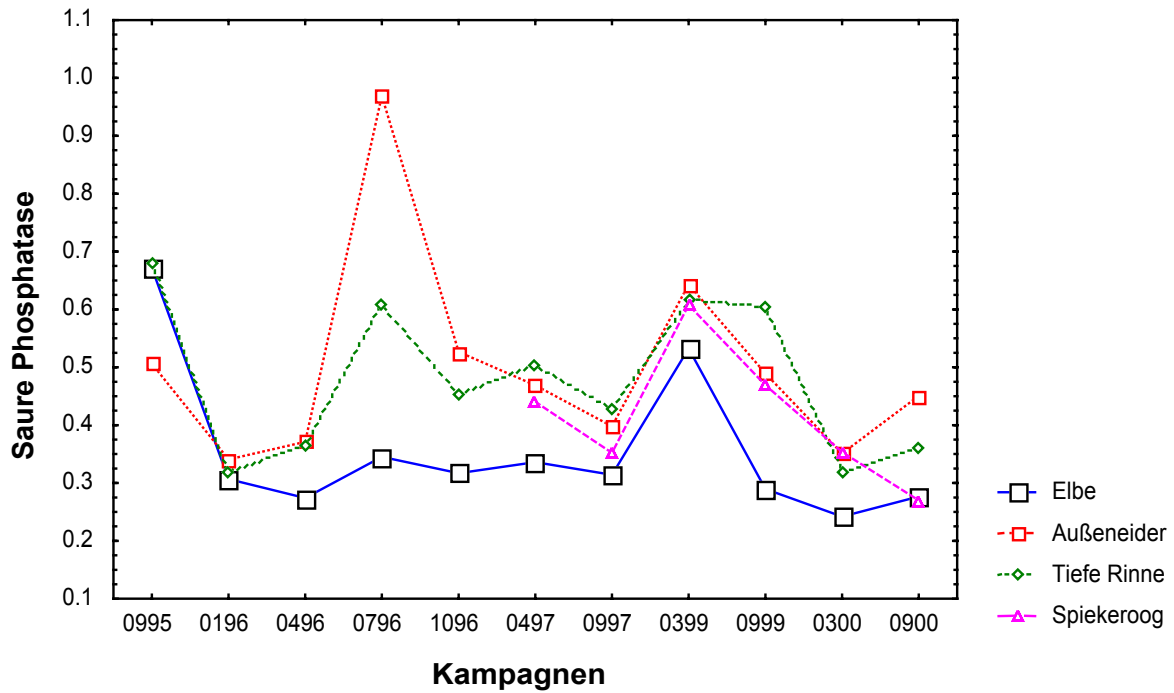


Abb. 3.4.: Makrophagenaggregate in der Leber der Flunder: Mittelwert-Interaktionsplot der Sauren Phosphatase Aktivität auf allen Stationen während der einzelnen Kampagnen in männlichen und weiblichen Flundern.

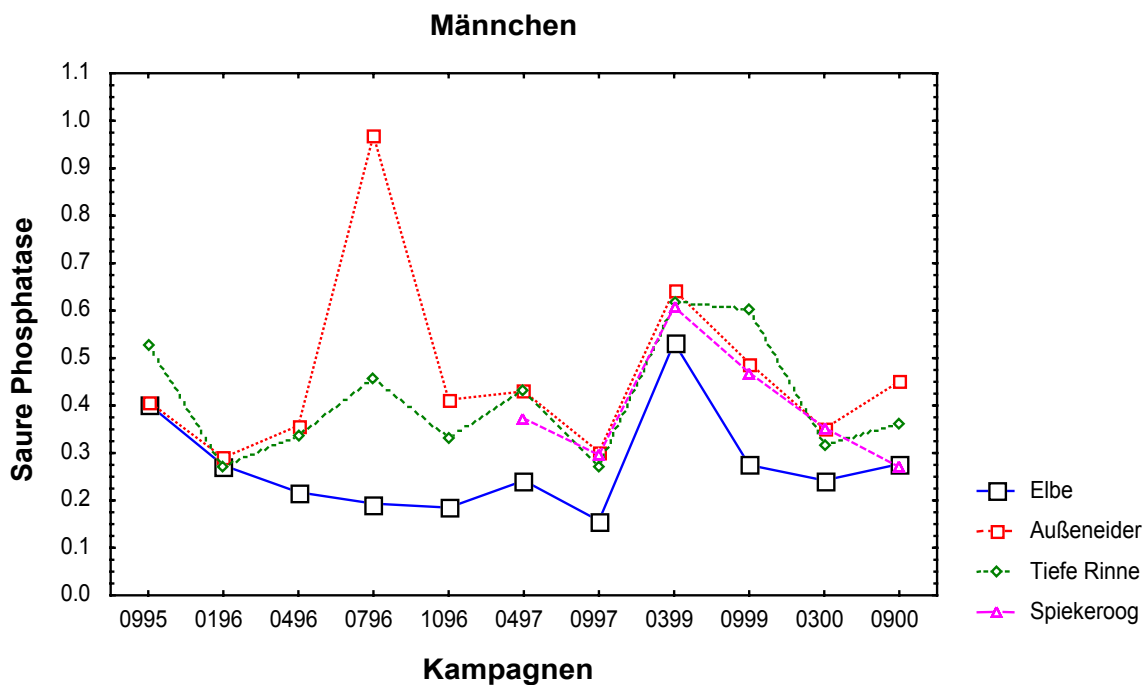


Abb. 3.5.: Makrophagenaggregate in der Leber der Flunder: Mittelwert-Interaktionsplot der Sauren Phosphatase Aktivität auf allen Stationen während der einzelnen Kampagnen in männlichen Flundern.

Die MA-SP Aktivität war in allen Kampagnen in Flundern von der am stärksten belasteten Elbe-Station am niedrigsten, völlig unabhängig von saisonalen Schwankungen. Dies wurde besonders deutlich, bei Betrachtung der männlichen Fische (Abb. 3.5). In manchen Kampagnen waren die Unterschiede zu den anderen untersuchten Gebieten allerdings sehr gering (0995/ Eider), beziehungsweise gar nicht wahrzunehmen (0196 alle Stationen, 0900/ Spiekeroog).

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes wurde eine Probennahme im Winter durchgeführt (Januar 1996). Die Ergebnisse dieser Beprobung zeigten, dass bei extrem niedrigen Temperaturen die Aktivität der Sauren Phosphatase zusammenbricht, unabhängig von der anthropogenen Belastung, der die Flundern ausgesetzt waren. Die Wassertemperaturen lagen während dieser Probennahme bei 4 °C.

Betrachtet man die Tiefe Rinne, als relativ gering belastetes Gebiet, dann erkennt man im Jahresverlauf die schwankende Aktivität der Sauren Phosphatase (Abb. 3.6). Es wird deutlich, dass die Aktivität der Sauren Phosphatase im Winter besonders niedrig war (0,25) und im Sommer die höchsten Werte zeigte (0,5). Im Herbst und im Frühjahr waren die gemessenen Werte vergleichbar (zwischen 0,3 und 0,37). Dieser Jahresgang wurde im Jahr 1996 ermittelt. Es muss daher auch in Betracht gezogen werden, dass auch diese Werte zum Teil anthropogen beeinflusst worden sind, da im Frühjahr 1996 eine Giftfracht die Flundern aus der Elbe aber auch weiter entfernter Gebiete extrem beeinträchtigt hatte (Broeg et al., 1999, Broeg et al., 2002). Aber auch die Untersuchungen der Flundern aus der Außeneider ergaben einen Jahresgang der Sauren Phosphatase Aktivität, der mit dem unten demonstrierten konform war.

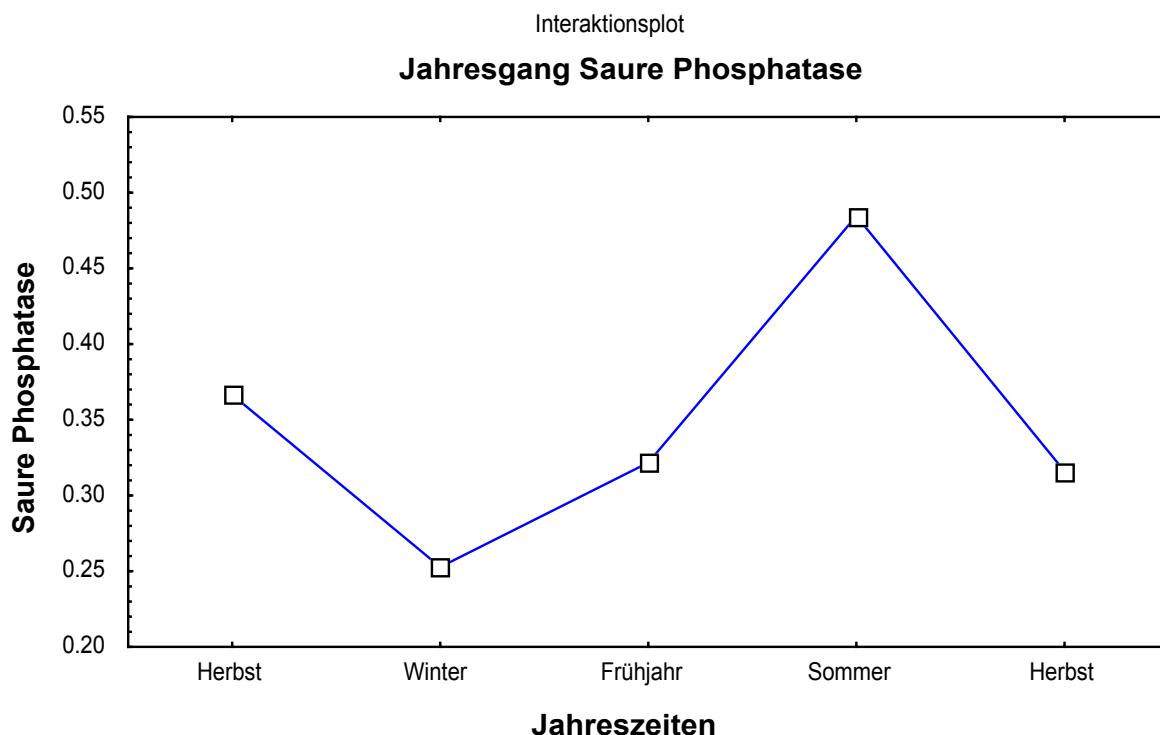


Abb. 3.6.: Jahresgang der Sauren Phosphatase Aktivität in MA von Flundern der gering belasteten Tiefen Rinne (Herbst 1995 bis Herbst 1996).



Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen folgt, dass sich die Saure Phosphatase Aktivität nur als Monitoringparameter eignet, wenn folgende Voraussetzungen berücksichtigt werden:

- Beprobung ausschließlich außerhalb der Reproduktionszeit.
- Untersuchung von männlichen Fischen, bzw. Festlegung auf ein Geschlecht.
- Prinzipiell ist eine Beprobung zu jeder Jahreszeit möglich, temperaturbedingte Schwankungen der Enzymaktivität müssen aber berücksichtigt werden durch gleichzeitige Beprobung eines Referenzgebietes mit gleicher Temperatur. Am besten geeignet sind aus den oben genannten Gründen der Herbst und das Frühjahr.

Bei der Untersuchung der mittleren Größe der Makrophagen Aggregate muss zwischen zwei Phasen der Felduntersuchung unterschieden werden. In der ersten Phase der Studie (September 1995 bis September 1997) wurde die Größe der Makrophagen Aggregate aus **einem** Cryoschnitt bestimmt. Alle Aggregate, die sich in einem Schnitt finden ließen (aber mindestens 3) wurden gemessen und aus diesen Werten wurde die mittlere Größe berechnet. Alle Fische, bei denen keine Aggregate gefunden wurde, wurden mit 0 bewertet. In der zweiten Phase der Studie wurden für jedes Tier so viele Schnitte angefertigt, bis sich genug Makrophagen Aggregate für die Auswertung finden ließen. Außerdem konnten durch eine Verfeinerung der Meßtechnik auch kleinere Makrophagen Aggregate und zum Teil auch Einzelmakrophagen gemessen werden, was die mittlere Größe der Aggregate in der zweiten Phase der Untersuchungen herabsetzte. Für jedes Tier gibt es also in dieser zweiten Phase einen Meßwert. Im Folgenden wird die erste Phase mit A, die zweite Phase mit B bezeichnet.

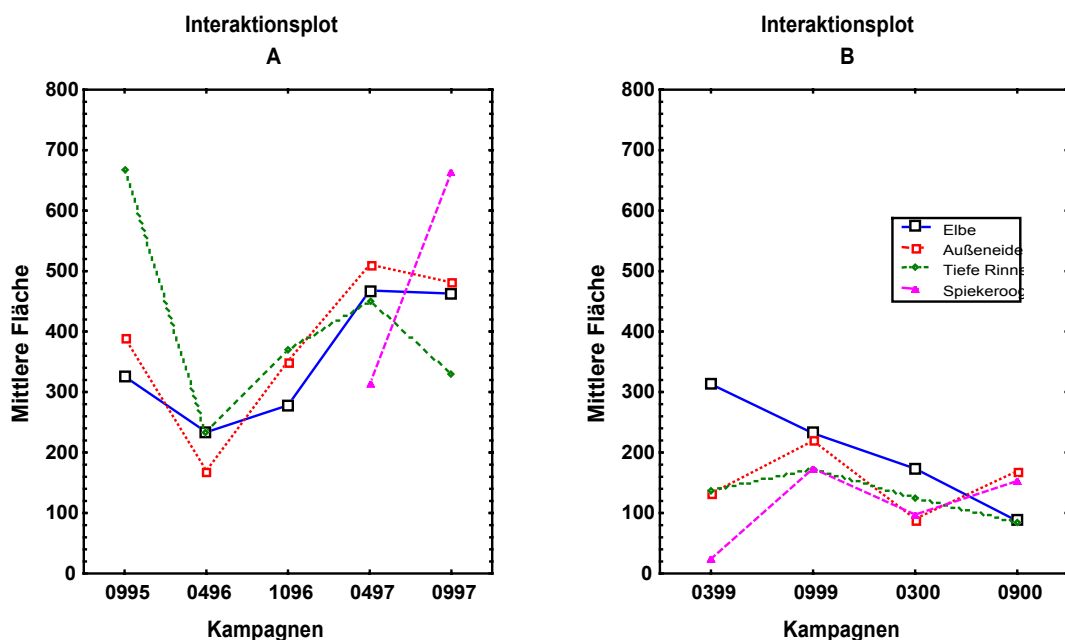


Abb. 3.7.: Mittlere Größe der Makrophagen Aggregate (Mittelwerte in  $\mu\text{m}^2$ ) männlicher Flundern von verschiedenen Stationen in der Deutschen Bucht während der Jahre 1995-1997 (A) und 1999-2000 (B).

Bei der Größe der Aggregate in männlichen Flundern zeigte sich, ähnlich wie bei der Makrophagenaktivität eine saisonale Schwankung mit geringer MA-Größe im Winter und größeren MA im Sommer. Bei einem Vergleich zwischen im Herbst und im Frühjahr gefangenen Flundern waren die MA im Herbst größer als im Frühjahr (Abb. 3.7).

## Schadstoffeffekte

### Rückstandsanalytik in der Leber

Die deutlichsten Zusammenhänge zwischen der Aktivität der Sauren Phosphatase und den in den Flundern analysierten Rückständen chlororganischer Kohlenwasserstoffe ließen sich erkennen, wenn die Rückstände im Lebergewebe gemessen wurden. Wie schon im vorherigen Abschnitt festgestellt, unterliegen die Makrophagen Aggregate der weiblichen Flundern außer den Schadstoffeffekten auch endogenen Einflüssen, wie zum Beispiel endokrinologischen Veränderungen im Lauf der Reproduktionsphase. Ein weiterer Hinweis darauf war die Tatsache, dass sich bei geringer Stichprobenzahl (n=20) ohne vorherige Trennung der Geschlechter nur wenig Korrelationen mit den gemessenen Schadstoffen feststellen ließen. Es war zwar für alle Schadstoffe, außer für Lindan (auf Fett bezogen) ein negativer, suppressiver Einfluß auf die Aktivität der Sauren Phosphatase zu erkennen, diese Korrelationen waren aber in den meisten Fällen nicht statistisch signifikant, wenn männliche und weibliche Fische gemeinsam betrachtet wurden. Trennte man die Geschlechter, so wurden bestimmte Zusammenhänge zwischen Schadstoffen und Saurer Phosphatase Aktivität in den Makrophagen Aggregaten deutlich (Tab. 3.3, 3.4).

Tabelle 3.3.: Spearmans Rangkorrelation, männliche Flundern

	Gültige	Spearman		
	N	R	t(N-2)	p-Niveau
MA-Größe & HCB	7	-.872727	-3.99723	.010352
MA-Größe & LINDAN	7	-.900937	-4.64238	.005621
MA-Größe & DIELDRIN	7	-.836364	-3.41162	.019010
MA-Größe & OCS	7	-.897549	-4.55186	.006102
MA-Größe & p,p-DDD	7	-.882919	-4.20481	.008450
MA-Größe & p,p-DDE	7	-.846881	-3.56101	.016197
MA-Größe & o,p-DDT	7	-.953646	-7.08607	.000867
MA-Größe & p,p-DDT	7	-.720750	-2.32495	.067635
MA-Größe & PCB28	7	-.666694	-2.00015	.101920
MA-Größe & PCB52	7	-.872727	-3.99723	.010352
MA-Größe & PCB101	7	-.756787	-2.58885	.048905
MA-Größe & PCB138	7	-.576600	-1.57806	.175382
MA-Größe & PCB153	7	-.720750	-2.32495	.067635
MA-Größe & PCB180	7	-.576600	-1.57806	.175382
SP & HCB	7	-.872727	-3.99723	.010352
SP & LINDAN	7	-.900937	-4.64238	.005621
SP & DIELDRIN	7	-.836364	-3.41162	.019010
SP & OCS	7	-.897549	-4.55186	.006102
SP & p,p-DDD	7	-.882919	-4.20481	.008450
SP & p,p-DDE	7	-.846881	-3.56101	.016197
SP & o,p-DDT	7	-.953646	-7.08607	.000867
SP & p,p-DDT	7	-.720750	-2.32495	.067635
SP & PCB28	7	-.666694	-2.00015	.101920
SP & PCB52	7	-.872727	-3.99723	.010352
SP & PCB101	7	-.756787	-2.58885	.048905
SP & PCB138	7	-.576600	-1.57806	.175382
SP & PCB153	7	-.720750	-2.32495	.067635
SP & PCB180	7	-.576600	-1.57806	.175382

Für alle Schadstoffe wurde ein Zusammenhang zwischen steigender Rückstandskonzentration und Abnahme der Aggregat Größe und der MA-SP Aktivität festgestellt und zwar ohne Ausnahme. In den meisten Fällen war diese Korrelation statistisch signifikant. Leider war die Stichprobenzahl relativ gering, aber dafür war das Ergebnis der Berechnungen sehr eindeutig. Mit den in der Leber gemessenen Schadstoffen verfügt man über die Menge der metabolisch "aktiven" Schadstoffe, das bedeutet über die Schadstoffe, die nicht im Körperfett oder im Muskel dauerhaft eingelagert, beziehungsweise festgelegt sind. Die Reaktionen der physiologischen Parameter, wie in diesem Fall die Antwort des nicht-spezifischen Immunsystems ist daher direkt vom Einfluss der gemessenen Schadstoffe beeinflusst. Dadurch konnte es zu deutlicheren Korrelationen zwischen den gemessenen Schadstoffen und den Makrophagenparametern kommen, als bei es bei den rückstandsanalytischen Messungen im Muskelgewebe der Fall war (siehe folgenden Abschnitt). Man kann also mutmaßen, dass die Schadstoffkonzentration in der Leber dem akuten Belastungsgrad entspricht, die des Muskelgewebes dem chronischen Belastungsgrad.

So zeigte sich zum Beispiel, dass mit steigendem Gehalt von Dieldrin in der Leber männlicher Flundern die Aktivität der Sauren Phosphatase linear, das heißt konzentrationsabhängig gehemmt war (Abb.3.8).

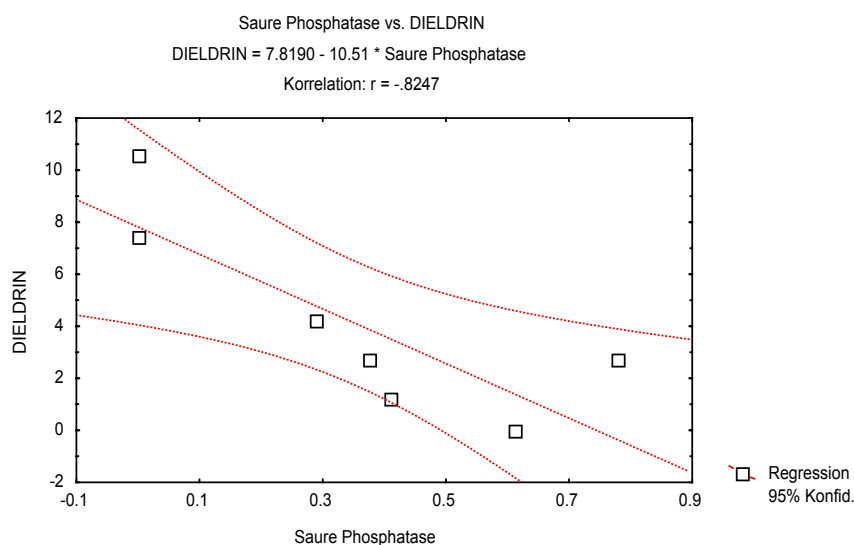


Abb. 3.8: Aktivität der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten und Rückstände von Dieldrin (in µg/kg Frischgewicht) in der Leber von männlichen Flundern aus der Deutschen Bucht.

Bei den weiblichen Flundern wurden bis auf eine Ausnahme keinerlei Zusammenhänge zwischen Schadstoffbelastung und nicht-spezifischer Immunantwort in der Leber festgestellt (Tab. 3.4). Die einzige akute Wirkung, die nachgewiesen wurde war eine Erhöhung der Sauren Phosphatase Aktivität in MA mit steigender Konzentration von PCB 28 (Abb. 3.9).

Tab. 3.4: Spearmans Rangkorrelation, weibliche Flundern.

	Gültige	Spearman		
	N	R	t(N-2)	p-Niveau
Größe & HCB	11	-.101152	-.30502	.767287
Größe & LINDAN	11	.211499	.64918	.532435
Größe & DIELDRIN	11	-.271892	-.84761	.418626
Größe & OCS	11	-.144338	-.43759	.671993
Größe & p,p-DDD	11	-.284416	-.89000	.396631
Größe & p,p-DDE	11	.009175	.02753	.978641
Größe & o,p-DDT	11	-.190095	-.58088	.575578
Größe & p,p-DDT	11	-.018349	-.05506	.957296
Größe & PCB 28	11	.308759	.97386	.355572
Größe & PCB 52	11	-.216097	-.66398	.523347
Größe & PCB 101	11	.036699	.11017	.914692
Größe & PCB 138	11	.009175	.02753	.978641
Größe & PCB 153	11	.036699	.11017	.914692
Größe & PCB 180	11	.018349	.05506	.957296
SP & HCB	11	-.133336	-.40361	.695918
SP & LINDAN	11	-.045978	-.13808	.893217
SP & DIELDRIN	11	.082950	.24971	.808417
SP & OCS	11	-.356033	-1.14299	.282534
SP & p,p-DDD	11	-.155970	-.47371	.646989
SP & p,p-DDE	11	.091747	.27641	.788478
SP & o,p-DDT	11	-.375188	-1.21427	.255545
SP & p,p-DDT	11	-.009175	-.02753	.978641
<b>SP &amp; PCB 28</b>	<b>11</b>	<b>.760377</b>	<b>3.51223</b>	<b>.006595</b>
SP & PCB 52	11	-.078163	-.23521	.819312
SP & PCB 101	11	.146795	.44521	.666685
SP & PCB 138	11	.183494	.55999	.589151
SP & PCB 153	11	.165145	.50233	.627495
SP & PCB 180	11	-.036699	-.11017	.914692

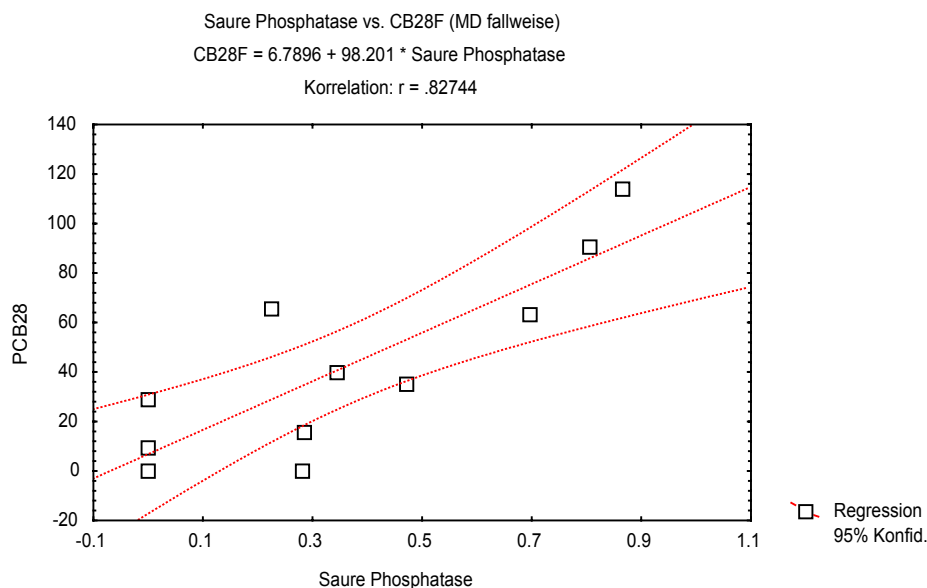


Abb. 3.9: Aktivität der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten und Rückstände von PCB 28 (in µg/kg Fett) in der Leber von weiblichen Flundern aus der Deutschen Bucht.

Diese hier beschriebenen Zusammenhänge waren geschlechtsspezifisch, das heißt bei dem jeweilig anderen Geschlecht waren sie nicht zu erkennen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Wirkprinzip, das diesen Zusammenhängen zugrunde liegt auch auf endokrinologischer Basis zu suchen ist.

#### Rückstandsanalytik im Muskel

Da in dieser interdisziplinären Studie die Leber für zahlreiche biochemische und histochemische Untersuchungen genutzt wurde, war es in den meisten Fällen nicht möglich die rückstandsanalytischen Messungen auch im Lebergewebe durchzuführen. Daher wurden diese Untersuchungen zwar auf individueller Basis, das heißt in den Fischen, in denen auch die physiologischen Parameter untersucht wurden, aber im Muskel- anstelle des Lebergewebes durchgeführt. Da die Zusammenhänge zwischen der Belastung und den physiologischen Parametern deutlicher sind, wenn sich die Rückstandsangaben nicht auf den Fettgehalt sondern auf das Frischgewicht des untersuchten Fisches beziehen (Wahl et al., 1995), wurde in allen folgenden statistischen Berechnungen so verfahren.

Eine Zusammenfassung der Korrelationen der gesamten Rückstandsanalytik der Organochlorverbindungen im Muskelgewebe gibt Tabelle 3.5.

Tab. 3.5.: Spearmans Rangkorrelation, gesamte Rückstandsanalytik im Muskelgewebe 1995-2000.

	N	R	t(N-2)	p-Niveau
Größe & HCB	231	.119531	1.82189	.069776
Größe & LINDAN	231	.013711	.20750	.835806
Größe & DIELDRIN	231	.024413	.36954	.712065
Größe & OCS	231	.006756	.10223	.918661
Größe & p,p-DDD	231	.078631	1.19360	.233870
Größe & p,p-DDE	231	.061910	.93868	.348886
Größe & o,p-DDT	231	-.093920	-1.42758	.154775
Größe & PCB 28	231	.090536	1.37570	.170258
Größe & PCB 52	231	.142892	2.18477	.029920
Größe & PCB 101	231	.120348	1.83454	.067872
Größe & PCB 138	231	.155889	2.38823	.017741
Größe & PCB 153	231	.145025	2.21808	.027532
Größe & PCB 180	221	.129551	1.93347	.054467
SP & HCB	231	-.135403	-2.06807	.039756
SP & LINDAN	231	-.076514	-1.16127	.246742
SP & DIELDRIN	231	.147945	2.26372	.024528
SP & OCS	231	-.162997	-2.50003	.013119
SP & p,p-DDD	231	-.172731	-2.65378	.008517
SP & p,p-DDE	231	-.178287	-2.74190	.006591
SP & o,p-DDT	231	-.190170	-2.93129	.003718
SP & PCB 28	231	-.055895	-.84716	.397788
SP & PCB 52	231	-.174121	-2.67581	.007993
SP & PCB 101	231	-.215092	-3.33294	.001002
SP & PCB 138	231	-.038457	-.58239	.560877
SP & PCB 153	231	-.038270	-.57956	.562780
SP & PCB 180	221	-.127307	-1.89943	.058822

Für folgende Stoffe wurden signifikant negative Korrelationen zwischen Konzentration im Muskelgewebe und MA-SP Aktivität in der Leber nachgewiesen: HCB, OCS, PCB 52 und 101, DDE, DDD, DDT. Bei Dieldrin konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen SP Aktivität und Schadstoffkonzentration festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Rückstandsanalytik/SP- Korrelation im Lebergewebe männlicher Flundern.

Die Größe der Makrophagen Aggregate scheint in einem indirekten Zusammenhang mit der Schadstoffbelastung im Gewebe zu stehen. Die Korrelationsmatrix der gesamten Schadstoffanalytik mit der Aktivität der Makrophagen Aggregate und ihrer Größe zeigte, dass bei den Schadstoffen, die mit zunehmender Konzentration zu einer Erniedrigung der SP-Aktivität führten, eine Vergrößerung der Aggregat Größe zu beobachten war. Bei PCB 52 war sowohl die Erniedrigung der SP-Aktivität, als auch die Vergrößerung der Aggregat Größe bei wachsender Stoffkonzentration im Muskelgewebe signifikant ( $p < 0,005$ /  $p < 0,05$ ). Die Reaktionen der Enzymaktivität auf die Schadstoffkonzentrationen waren aber in allen Fällen deutlicher, als die der Aggregat Größe, das heißt die Irrtumswahrscheinlichkeit war niedriger.

Es konnte generell festgestellt werden, dass die Größe der Makrophagen Aggregate in männlichen Flundern nicht signifikant mit dem Gehalt an chlororganischen Schadstoffen im Muskelgewebe der Flundern korreliert war. Auch konnten keine einheitlichen Reaktionen beobachtet werden. So war der Zusammenhang zwischen Schadstoffgehalt und Größe der Aggregate bei manchen Schadstoffen positiv (HCB, DDT, PCBs), bei anderen negativ (Lindan, Dieldrin, OCS, DDE, DDD) und variierte sogar innerhalb einer Stoffklasse.

Dieses Ergebnis mag die Ursache dafür sein, dass der alleinige Einsatz der Makrophagenaggregat-Größe als Biomarker von vielen Autoren skeptisch gesehen wurde und einige diesbezügliche Studien keine eindeutigen Ergebnisse erbracht haben (Haaparanta et al., 1996).

In Verbindung mit der Aktivität der Sauren Phosphatase als Parameter der Funktion von Makrophagenzentren, gab die Bestimmung der Größe der Zentren wichtige Hinweise. So war die signifikante Herabsetzung der Enzymaktivität durch PCB 52 in weiblichen Flundern mit einer Vergrößerung der Makrophagen Aggregate verbunden (Tab. 3.7). Eine hochgradige, wenn auch nicht signifikante Verringerung der Größe wurde im Zusammenhang mit der DDT Belastung im Muskelgewebe ermittelt (grün markiert).

Tab. 3.6.: Spearmans Rangkorrelation, männliche Flundern. Grün markiert, deutliche Zusammenhänge, aber nicht statistisch signifikant  $0,05 < p < 0,1$ , rot markiert, statistisch signifikante Korrelationen,  $p < 0,05$ .

MD paarw. Ausschluß

	N	R	t(N-2)	p-Niveau
Größe & HCB	129	.046441	.52393	.601240
Größe & LINDAN	129	-.066741	-.75382	.452354
Größe & DIELDRIN	129	-.046985	-.53008	.596983
Größe & OCS	129	-.081990	-.92710	.355631
Größe & p,p-DDD	129	-.053664	-.60564	.545836
Größe & p,p-DDE	129	-.026373	-.29731	.766713
Größe & o,p-DDT	129	-.152344	-1.73711	.084792
Größe & p,p-DDT	129	.117137	1.32922	.186160
Größe & PCB 52	129	.056576	.63861	.524229
Größe & PCB 101	129	.044094	.49739	.619771
Größe & PCB 138	129	.129255	1.46895	.144319
Größe & PCB 153	129	.110115	1.24853	.214134
Größe & PCB 180	123	.088888	.98165	.328231
SP & HCB	129	-.168837	-1.93041	.055785
SP & LINDAN	129	-.003723	-.04196	.966600
SP & DIELDRIN	129	.147724	1.68323	.094787
SP & OCS	129	-.182462	-2.09135	.038489
SP & p,p-DDD	129	-.170304	-1.94768	.053660
SP & p,p-DDE	129	-.116163	-1.31801	.189873
SP & o,p-DDT	129	-.141835	-1.61473	.108851
SP & p,p-DDT	129	-.115028	-1.30496	.194267
SP & PCB 52	129	-.204472	-2.35402	.020106
SP & PCB 101	129	-.176773	-2.02401	.045067
SP & PCB 138	129	-.001610	-.01814	.985556
SP & PCB 153	129	-.006229	-.07019	.944150
SP & PCB 180	123	-.113970	-1.26189	.209415

Bei den weiblichen Flundern stellten sich die Zusammenhänge zwischen Schadstoffanalytik im Muskel und Makrophagenparametern wie folgt dar (Tabelle 3.7). Im Hinblick auf die Größe der Makrophagen Aggregate waren die Zusammenhänge wesentlich deutlicher, als bei den männlichen Artgenossen. Bis auf eine Ausnahme, nämlich DDT, das auch bei den männlichen Flundern zu einer deutlichen Abnahme der Aggregat Größe führte, konnten in den weiblichen Flundern ausschließlich positive Zusammenhänge zwischen der Aggregat Größe und der Belastung mit Chlorkohlenwasserstoffen festgestellt werden. Diese Zusammenhänge waren in einigen Fällen statistisch signifikant. Die Korrelationen zwischen Aggregat Größe und Schadstoffbelastung im Muskelgewebe waren bei weiblichen Fischen im Gegensatz zu ihren männlichen Artgenossen deutlicher, als die Korrelationen zwischen Schadstoffbelastung und SP-Aktivität. Besonders hohes immunmodulatorisches Potential konnte für beide Geschlechter, sowohl was die Herabsetzung der SP-Aktivität, als die Vergrößerung der Aggregat Größe angeht für folgende Substanzen festgestellt werden: DDD, DDE, DDT, HCB und die PCB-Congenere 52 und 101, wobei die Zusammenhänge zwischen der Belastung mit DDT-Metaboliten und Immunantwort bei den weiblichen Flundern deutlicher war.

Tab. 3.7.: Spearmans Rangkorrelation, weibliche Flundern. Grün markiert, deutliche Zusammenhänge, aber nicht statistisch signifikant  $0,05 < p < 0,1$ , rot markiert, statistisch signifikante Korrelationen,  $p < 0,05$ .

MD paarw. Ausschluß

	Gültige N	Spearman R	t(N-2)	p-Niveau
Größe & HCB	102	.198682	2.02724	.045299
Größe & LINDAN	102	.113190	1.13922	.257331
Größe & DIELDRIN	102	.115340	1.16115	.248346
Größe & OCS	102	.117809	1.18635	.238296
Größe & p,p-DDD	102	.237472	2.44465	.016249
Größe & p,p-DDE	102	.160545	1.62655	.106980
Größe & o,p-DDT	102	-.018851	-.18854	.850833
Größe & PCB 28	102	.181947	1.85036	.067214
Größe & PCB 52	102	.263863	2.73557	.007369
Größe & PCB 101	102	.204981	2.09428	.038764
Größe & PCB 138	102	.180889	1.83923	.068849
Größe & PCB 153	102	.174878	1.77615	.078750
Größe & PCB 180	98	.181012	1.80334	.074472
SP & HCB	102	-.101572	-1.02100	.309720
SP & LINDAN	102	-.159775	-1.61854	.108696
SP & DIELDRIN	102	.139861	1.41249	.160909
SP & OCS	102	-.106276	-1.06882	.287725
SP & p,p-DDD	102	-.163636	-1.65872	.100306
SP & p,p-DDE	102	-.266554	-2.76560	.006768
SP & o,p-DDT	102	-.249662	-2.57827	.011387
SP & PCB 28	102	-.041915	-.41952	.675737
SP & PCB 52	102	-.138405	-1.39750	.165356
SP & PCB 101	102	-.228253	-2.34441	.021034
SP & PCB 138	102	-.023463	-.23469	.814929
SP & PCB 153	102	-.032525	-.32542	.745540
SP & PCB 180	98	-.137460	-1.35973	.177100



Bei den Schwermetallen zeigten Quecksilber und Kupfer die stärksten Auswirkungen auf die unspezifische Immunantwort in der Leber. Die Belastung mit Quecksilber war signifikant positiv korreliert mit der Größe der Makrophagen Aggregate und der Aktivität der Sauren Phosphatase. Für Kupfer wurde eine negative Korrelation zwischen Konzentration dieses Schwermetalles im Muskelgewebe und Aktivität der Sauren Phosphatase festgestellt (Tab.3.8).

Anders als bei den Rückständen von Organochlorverbindungen im Flundergewebe wurden bei den Schwermetallen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Reaktionen männlicher und weiblicher Fische auf Kupfer und Quecksilber ermittelt. In Tab. 3.8. sind daher männliche und weibliche Flundern zusammengefasst.

Tab. 3.8.: Spearmans Rangkorrelation für Schwermetalle und MA-Parameter MD paarw. Ausschluß

	Gültige	Spearman		
	N	R	t(N-2)	p-Niveau
Größe & Hg	194	.184993	2.60835	.009814
Größe & Cd	31	-.114393	-.62010	.540035
Größe & Cu	202	.060600	.85859	.391594
Größe & Pb	20	.006860	.02911	.977100
Größe & Zn	29	.223658	1.19237	.243492
Größe & Fe	29	.212619	1.13066	.268144
Größe & Mn	29	.273575	1.47792	.151002
SP & Hg	194	.364219	5.41898	.000000
SP & Cd	31	-.042500	-.22908	.820417
SP & Cu	202	-.298237	-4.41880	.000016
SP & Pb	20	.170812	.73550	.471509
SP & Zn	29	.244652	1.31109	.200868
SP & Fe	29	.086812	.45280	.654312
SP & Mn	29	.302702	1.65031	.110467

#### Schadstoffbelastung im Muskelgewebe von weiblichen und männlichen Flundern

Die folgende Tabelle 3.9. demonstriert die unterschiedliche Belastung des Muskelgewebes von männlichen und weiblichen Flundern mit chlororganischen Schadstoffen bei gleichem Lipidgehalt im Muskel (0,6 g/kg). Männliche Fische waren im Durchschnitt mit allen Schadstoffen höher belastet. Für einige relevante Schadstoffe wie: Lindan, OCS, DDD und die PCB Congenere 101, 138 und 153 war der Unterschied zwischen den Rückständen im Muskel weiblicher und männlicher Fische signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,05$ , Tab. 3.9.).

Bei den Schwermetallen war kein einheitliches Bild erkennbar. Zum Teil waren weiblicher Fische höher belastet, zum Teil männliche. Bei zwei Metallen (Eisen und Kupfer) zeigten sich aber signifikant höhere Rückstandskonzentrationen in männlichen Flundern (Tab. 3.10).

Tabelle 3.9.: Mann-Whitney U-Test Organochlorverbindungen  
 Nach Variabel: Geschlecht  
 Gr. 1: m= männlich, Gr. 2: w= weiblich

	Rgsumme	Rgsumme				Z		Gült. N	Gült. N
	m	w	U	Z	p-Niveau	korr.	p-Niveau	m	w
HCB	13424	8942.0	4937.0	1.1233	.2613	1.2184	.2231	122	89
LINDAN	13343.	9023.5	5018.5	.9373	.3486	2.0421	.0411	122	89
DIELDRIN	13094.	9272.5	5267.5	.3687	.7123	.5242	.6001	122	89
OCS	13789	8577.0	4572.0	1.9567	.0504	2.4593	.0139	122	89
p,p-DDD	13825	8541.0	4536.0	2.0389	.0415	2.1692	.0301	122	89
p,p-DDE	13763.	8603.5	4598.5	1.8962	.0579	1.9084	.0563	122	89
o,p-DDT	13021	9345.0	5340.0	.2032	.8390	1.2108	.2260	122	89
PCB 28	12977.	9389.5	5384.5	.1016	.9191	.8541	.3930	122	89
PCB 52	13235.	9131.5	5126.5	.6907	.4898	1.0790	.2806	122	89
PCB 101	14440.	7926.5	3921.5	3.4420	.0006	3.6765	.0002	122	89
PCB 138	14350.	8016.5	4011.5	3.2365	.0012	3.2373	.0012	122	89
PCB 153	14180	8186.0	4181.0	2.8495	.0044	2.8501	.0044	122	89
PCB 180	12430	7871.0	4216.0	1.7526	.0797	1.7911	.0733	116	85

Tabelle 3.10.: Mann-Whitney U-Test Schwermetalle  
 Nach Variabel: Geschlecht  
 Gr. 1: m= männlich, Gr. 2: w= weiblich

	Rgsumme	Rgsumme				Z		Gült. N	Gült. N
	m	w	U	Z	p-Niveau	korr.	p-Niveau	m	w
HG	9873.50	8654.5	4308.5	-.67571	.499233	-.67894	.497179	105	87
CD	343.5	152.5	86.5	.97022	.331942	.97278	.330671	20	11
CU	12040.5	8260.5	4074.5	2.26681	.023409	2.26857	.023301	110	91
PB	163.5	46.5	25.5	1.3609	.173556	1.3797	.167689	14	6
ZN	239.00	196.0	68.0	-1.39335	.163525	-1.39352	.163473	18	11
FE	322.50	112.500	46.5	2.35970	.018296	2.36115	.018224	18	11
MN	235.50	199.5	64.5	-1.55066	.120993	-1.55257	.120535	18	11

### *Schlussfolgerung*

- ◆ Es konnten Schadstoffe mit besonderer Relevanz für die nicht-spezifische Immunantwort aus den analysierten Substanzen herausgearbeitet werden. Bei den PCB- Congeneren waren dies insbesondere PCB 52 und PCB 101. Bei männlichen Flundern zeigten HCB, OCS und Dieldrin suppressive Effekte auf die MA-SP. Bei den weiblichen Fischen waren insbesondere die DDT-Metabolite o,p-DDT und p,p-DDE immunmodulatorisch wirksam. Bei den Schwermetalleffekten waren keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festzustellen. Hier waren es insbesondere Kupfer und Quecksilber, die einen extrem suppressiven (Cu), beziehungsweise einen induzierenden (Hg) Einfluss auf die MA-SP zeigten.
- ◆ Es waren deutliche Unterschiede zwischen den Korrelationen mit dem Schadstoffgehalt in der Leber und dem Schadstoffgehalt im Muskel festzustellen. Am deutlichsten waren die Korrelationen zwischen Organochlorkonzentrationen und MA-Parametern, wenn die Rückstände in den Lebern männlicher Flundern gemessen wurden.
- ◆ Es waren deutliche Unterschiede in der Reaktion von MA-Parametern auf Organochlorkonzentrationen und Fortpflanzungsstatus zwischen männlichen und weiblichen Flundern zu erkennen.

### *Weibchen*

- ◆ keine deutlichen Korrelationen der MA-SP-Aktivität mit den anderen Biomarkern.
- ◆ Abhängigkeit der MA-Parameter von der Laichreife. Signifikant herabgesetzte Aktivität in laichreifen weiblichen Flundern.
- ◆ Keine deutlichen Korrelationen der MA-Parameter mit den Organochlorkonzentrationen auf die Leberückstände bezogen (s.o).
- ◆ Deutliche Korrelationen der MA-Parameter auf die Organochlorrückstände im Muskel bezogen, das heißt gute Aussagen über die Veränderungen durch Schadstofffracht, der ein Fisch über einen längeren Zeitraum ausgesetzt ist.

### *Männchen*

- ◆ Deutliche Korrelationen der MA-Parameter mit den anderen Biomarkern für akute Toxizität in der Leber, keine endogenen Einflüsse durch Vitellogenese. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ob es durch endokrin wirksame Substanzen zu einer Veränderung, Angleichung an weibliche Verhältnisse im Hinblick auf die Reaktion der unspezifischen Immunantwort in der Leber kommt.
- ◆ Keine signifikante Abhängigkeit der MA Größe und SP Aktivität von der Laichreife.
- ◆ Eindeutige Korrelationen zwischen MA-Parametern und Organochlorkonzentrationen mit den in der Leber gemessenen Rückständen.

Mit Hilfe der Aktivität der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten von Flundern war es möglich, unterschiedlich belastete Gebiete voneinander zu trennen. Deutlich wurde allerdings eine starke geschlechtsspezifische Reaktion der Flundern betreffend der Effekte von Schadstoffen auf die nicht spezifische Immunantwort in der Leber. Während in männlichen Flundern deutliche negative Zusammenhänge zwischen Rückständen chlororganischer Schadstoffe in der Leber und Aktivität der Sauren Phosphatase festgestellt wurden, war in weiblichen Flundern kein Zusammenhang zu erkennen, sieht man von einer

Immunstimulation durch PCB 28 einmal ab. Deutliche Zusammenhänge zwischen Organochlorkonzentrationen und MA-Parametern waren in den Weibchen bezogen auf die Rückstände im Muskel zu ermitteln, wobei es hier hauptsächlich die Größe der MA war, die mit steigender Schadstoffkonzentration zunahm.

Für den Einsatz der MA-Parameter im biologischen Effektmonitoring bedeutet dies, dass ausschließlich männliche, oder ausschließlich weibliche Flundern untersucht werden sollten. Die endokrinen Zusammenhänge mit der nicht spezifischen Immunabwehr sind ein bisher unterschätztes Phänomen, das weiterer Aufklärung bedarf, gerade im Hinblick auf die Effekte endokrin wirksamer Schadstoffe auf die Immunantwort. Hier sei zum Beispiel TBT genannt, ein Schadstoff, der sowohl bei Schnecken zur Geschlechtsumkehr führt, als auch bekanntermaßen immunmodulierend wirkt. Interessanterweise führt aber auch Kupfer, eine Ersatzsubstanz für Antifoulinganstriche von Schiffen zu einer extremen Herabsetzung der Aktivität des unspezifischen Immunsystems, wie anhand dieser vorliegenden Arbeit für alle untersuchten Fischarten festgestellt wurde. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass diese Erkenntnisse aus Freilanduntersuchungen gewonnen wurden, man also davon ausgehen kann, dass die Freiland herrschenden Schadstoffbedingungen bereits so hoch sind, dass sie deutliche Effekte auf die Immunantwort zeigen.

### **Integrierte Auswertung der Daten**

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, ein Konzept für die Anwendung eines Biomarker Sets im Biologischen Effektmonitoring unter Einbindung von Markern für Immunmodulation zu entwickeln, mit dessen Hilfe sich die Umweltgesundheit unterschiedlicher Küstenhabitats in Nordsee, Mittelmeer und Rotem Meer bestimmen lässt. Dabei folgten wir den Gedanken von Cairns (1991), dass integrierte Wissenschaft erfordert, komplexe multivariate Systeme wie das Ökosystem in ihrer Gesamtheit zu betrachten und nicht in einzelnen Fragmenten.

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, wurde daher nicht allein der Grad der chemischen Belastung bestimmt, sondern der Frage nachgegangen, ob durch die Anwendung biologischer Parameter eine Störung des Systems festgestellt werden kann und zu ermitteln ist, wie weit diese Störung fortgeschritten ist.

Da es nicht möglich ist, das Ökosystem in seiner Gesamtheit zu betrachten, ist man darauf angewiesen, Bioindikatoren zu nutzen, deren Reaktion auf den Einfluss von Xenobiotika die belastungsbedingten Veränderungen des biologischen Systems sensibel reflektieren. Die daraus folgende Strategie war, Marker auf den verschiedenen Ebenen biologischer Organisation zu entwickeln und/oder anzuwenden und zwar auf einer individuellen Basis. Dies bedeutet, dass jeder Parameter in jedem untersuchten Fisch angewendet wurde, um eine Art physiologischen Status belastungsbedingter Veränderungen ermitteln zu können und die Fischgesundheit als einen Indikator für die Umweltgesundheit zu nutzen. Mit einbezogen wurden Marker von der biochemischen bis zur Ökosystem-Ebene, darunter auch Parameter, die bereits regelmäßig angewendet werden und von der ICES für den Einsatz im biologischen Effektmonitoring empfohlen worden sind (ICES 1996, 2002).

Die einzelnen angewendeten Parameter wurden bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben. Basierend auf den biologischen Daten, die im Rahmen des Projektes erhoben wurden, gab es unterschiedliche integrative Auswertungsansätze, die im Folgenden dargestellt werden.

*Die k-means Analyse (Schmolke et al., 1999)*

Bei dieser Analyse handelt es sich um eine spezielle Art von Clusteranalyse mit einer vordefinierten Anzahl extrahierter Cluster. Die Gesamtheit der untersuchten Flundern in der Nordsee wurde in zwei Gruppen von Fischen getrennt. Der mathematische Algorithmus, der dieser Analyse zugrunde liegt funktioniert wie eine reverse Varianzanalyse. Die Cluster wurden durch Gruppierung der Proben gebildet, unter dem Kriterium der Minimalisierung der Varianz innerhalb der jeweiligen Gruppe und Maximalisierung der Varianz zwischen den Gruppen. Es wurde getestet, ob es möglich ist, zwei Gruppen von Fischen signifikant voneinander zu trennen: Eine Gruppe unbelasteter/gesunder Flundern und eine zweite belastete Fischgruppe mit eingeschränkter Gesundheit.

Für diese Analyse wurden sämtliche erhobenen biologischen Parameter berücksichtigt. Daher mussten die Daten vor Einsatz in die Analyse vereinheitlicht werden. Aus diesem Grund wurde eine z-Transformation der Datenmatrix durchgeführt. Die Daten wurden standardisiert auf einen Parameter-Mittelwert von 0 und eine Standardabweichung von 1.

Ausgehend von dieser Datenmatrix war es möglich, zwei verschiedene Cluster mit einer annähernd gleich großen Anzahl von untersuchten Individuen zu extrahieren. Cluster 1 beinhaltete 95 Fische, Cluster 2 115. Alle mittleren Parameterwerte waren signifikant verschieden zwischen den beiden Gruppen (ANOVA, Tab. 3.11).

<b>Parameter</b>	<b>P</b>
MA-SP	0,000
MA-Größe	0,000
Neutrallipide/Leberfarbe	0,000
Lysosomenstabilität	0,000
EROD	0,000

Tab. 3.11: K-means Analyse: Signifikanztest (ANOVA), Unterschiede zwischen den gebildeten Clustern.

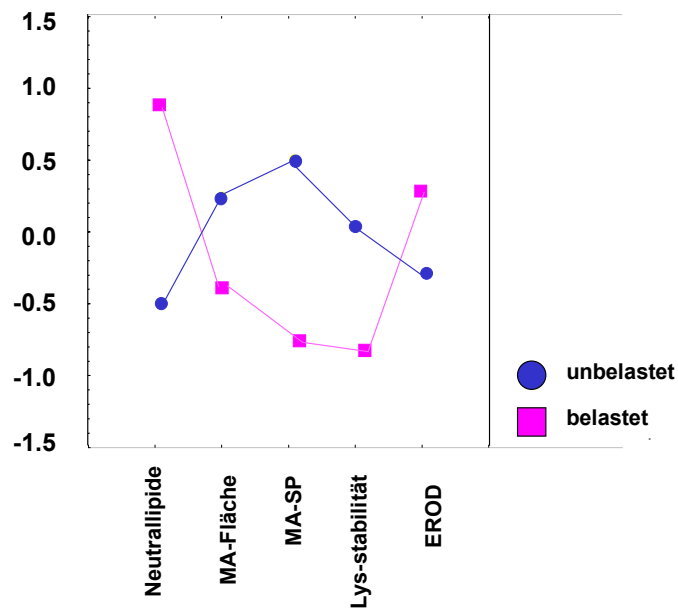


Abb. 3.11.: Ergebnisse der k-means Cluster-Analyse. Parameter Mittelwerte der standardisierten Datenmatrix (nach z-Transformation).

Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 3.11 dargestellt. Die Cluster sind abgebildet als Linien, die die standardisierten Parameter Mittelwerte verbinden (Cluster 1 blau, Cluster 2 violett). Cluster 1 repräsentiert die relativ unbelasteten Flundern, die eine niedrige Akkumulation von Neutrallipiden in der Leber, hohe MA-Größe und Aktivität, eine hohe Stabilität lysosomaler Membranen, sowie keine EROD-Induktion vorweisen. Cluster 2 repräsentiert belastete Flundern mit hoher Lipidakkumulation, geringer MA- Größe und MA-SP Aktivität, einer niedrigen Lysosomenstabilität und hoher EROD-Induktion.

In einem weiteren Schritt wurde die Verteilung der Flundern aus den jeweiligen Clustern in Raum und Zeit dargestellt (Abb. 3.12).

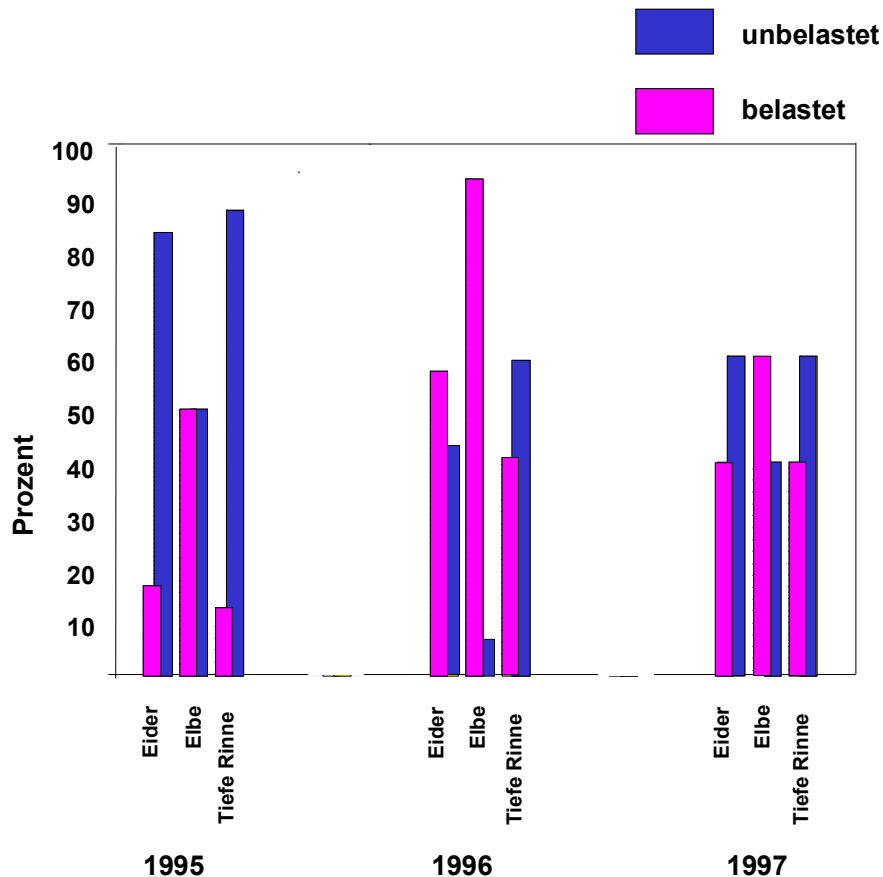


Abb. 3.12.: Aufteilung der Flundern aus Cluster 1 (unbelastet/blau) und Cluster 2 (belastet/violett) auf die verschiedenen Stationen während der Herbstprobennahmen 1995, 1996 und 1997.

Mit Beginn des Projektes im Herbst 1995 wurden in den relativ gering belasteten Gebieten der Außeneider und der Tiefen Rinne bei Helgoland mehr als 80 % gesunde Flundern (Cluster 1) gefangen. In der Elbemündung gehörten 50 % der Flundern Cluster 1, die anderen 50 % Cluster 2 an. Die Flundern waren also zur Hälfte belastet, zur Hälfte unbelastet. Ein Jahr später zeigte sich ein komplett verändertes Bild: Mehr als 90 % der Elbeflundern waren belastet. Sogar in der Außeneider wurden mehr belastete als unbelastete Flundern gefangen. Der Grund für diese Entwicklung lag in der Einleitung großer Mengen von DDT und PCBs in die Elbe, auch dokumentiert durch Messungen der Wassergütestelle Elbe (ARGE Elbe 1997) und die parallel durchgeführte Rückstandsanalytik an den untersuchten Fischen. Diese Schadstoffeinleitungen müssen Anfang des Jahres 1996 stattgefunden haben. Ein Jahr später hatte sich die Situation in der Elbe und der Eider wieder verbessert, nicht aber in der Tiefen Rinne. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bei Schadstoffeinleitungen in die Flüsse nicht nur die Organismen in den Flüssen und im Ästuarbereich betroffen sind, sondern mit einer Zeitverzögerung auch die Bewohner von Meeresgebieten, die weit von dem Ort des Eintrages entfernt lokalisiert sind und ebenso die extrem sensible Umwelt des Wattenmeeres.

### *Einstufung von Schädigungsgraden*

Nachdem es möglich war, mit Hilfe der k-means Analyse eine Trennung zwischen belastet/unbelastet auf Basis der biologischen Daten vorzunehmen, war die Frage, ob eine Abfolge der Schädigung der untersuchten Flundern nachvollzogen werden kann, also ob auf Basis der biologischen Daten eine Unterscheidung zwischen frühen Veränderungen und späten Effekten vorgenommen werden kann. Die Auswertung der Daten zeigte, dass die Stabilität lysosomaler Membranen in der Flunderleber der integrativste Parameter war, der angewendet wurde, dass heisst die meisten Korrelationen mit den anderen Biomarkern zeigte. Die Lysosomenmembranstabilität reflektierte unspezifische toxische Effekte auf das Lebergewebe zuverlässig und linear (Broeg et al., 1999, Broeg et al., 2002). Wie bereits von Köhler (1991) nachgewiesen, war die Lysosomenstabilität ein Spiegelbild belastungsbedingter histopathologischer Zellveränderungen in der Fischleber.

Aus diesen Gründen wurde die Lysosomenmembranstabilität als eine Basis für die Bewertung und Einordnung der anderen untersuchten Biomarker genutzt, um festzustellen zu welchem "Zeitpunkt" der Membranschädigung welche Reaktionen anderer Systeme gemessen werden können. Die Membranstabilität wurde zu diesem Zweck in 4 Klassen unterteilt:

Destabilisationszeit	≥ 20 Minuten	Referenz/ nicht belastet
Destabilisationszeit	>10<20 Minuten	Frühe Reaktion
Destabilisationszeit	5-10 Minuten	Mittelspäte Reaktion
Destabilisationszeit	<5 Minuten	Späte Reaktion

Alle anderen Biomarker Daten wurden nach diesen 4 Klassen gruppiert. Die Ergebnisse dieser Gruppierung sind in Abb. 3.13. dargestellt.



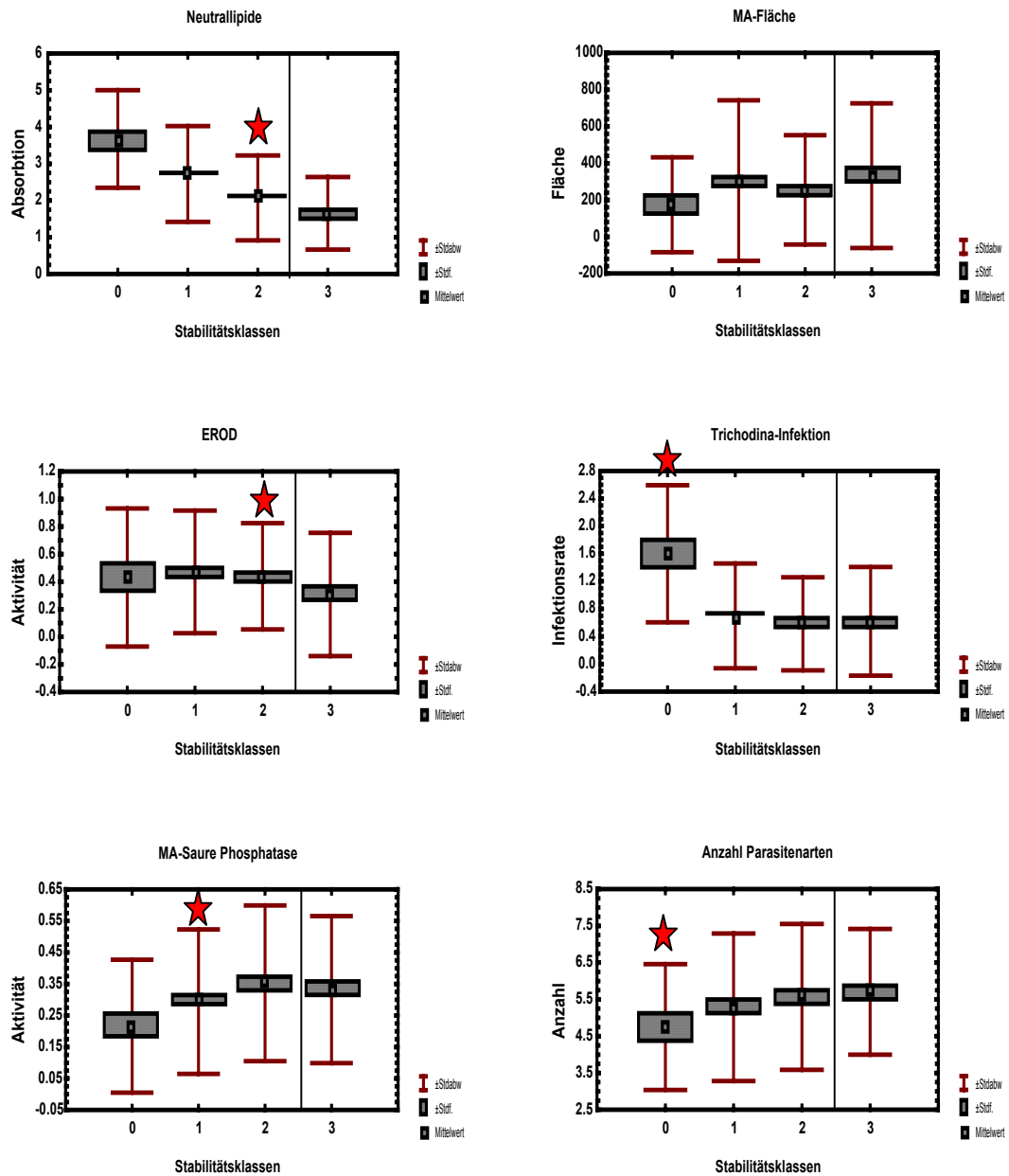


Abb. 3.13: Biomarkerdaten, gruppiert nach Lysosomenstabilitätsklassen (Flunder/Nordsee). Der rote Stern markiert den ersten signifikanten Anstieg/Abfall gegenüber dem Referenzwert (Klasse 3) (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Es zeigte sich, dass die anderen Biomarker bei unterschiedlichen Schädigungsgraden reagieren, das heißt, signifikante Veränderungen gegenüber ihren Referenzwerten zeigten. Während die Akkumulation von Neutrallipiden und die EROD-Aktivität bereits im Übergang von Referenzgruppe zu früher Schädigung reagierten (zwischen 3 und 2), änderte sich die Aktivität der Sauren Phosphatase in MA erst in der mittleren Schädigungsgruppe (1) signifikant gegenüber der Referenz. Die beiden parasitologischen Parameter *Trichodina-*

Infektion und die Anzahl verschiedener Parasitenarten in der Flunder zeigten eine signifikante Veränderung zur Referenz erst in der letzten Stabilitätsklasse (0), das heißt bei extremer Schädigung der Flundern.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Skala der Biomarkerantwort in der Flunder entwickelt, die ein Konzept für den sinnvollen Einsatz eines Biomarker-Sets im biologischen Effektmonitoring der Deutschen Bucht darstellt (3.14):

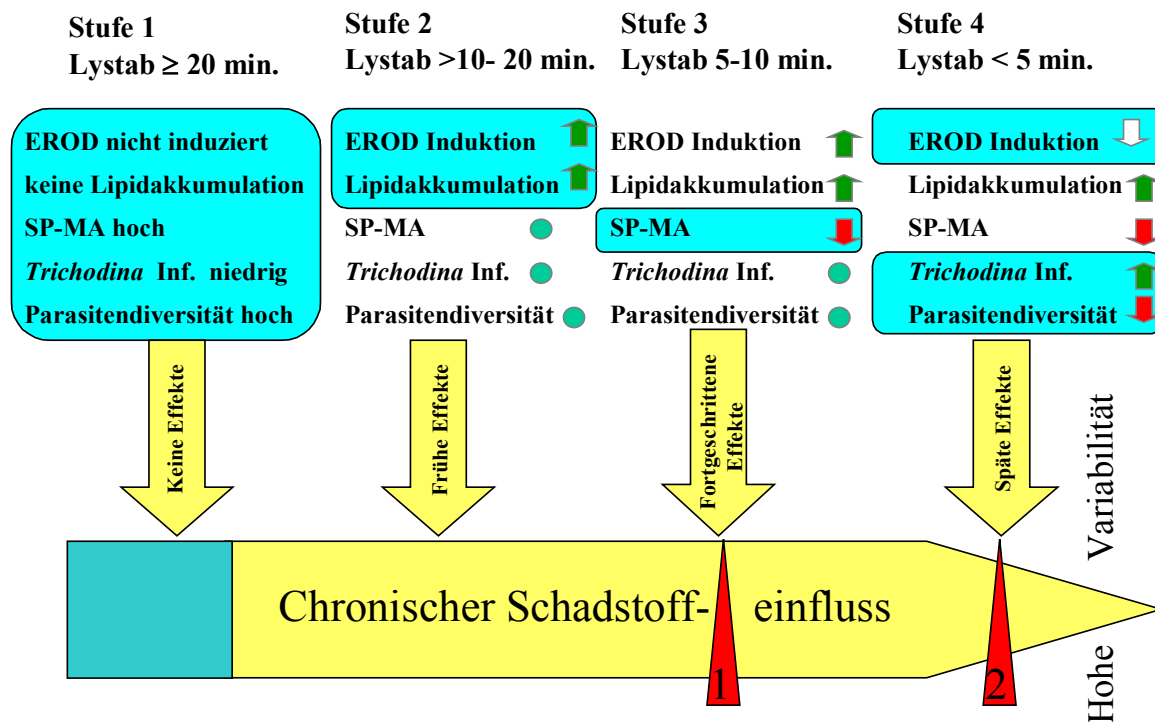


Abb. 3.14.: Skala der Biomarkerantwort

Es konnten mit Hilfe dieses Ansatzes 4 Stufen der Schädigung unterschieden werden, die jeweils durch Schlüsseffekte (blaue Kästen) charakterisiert wurden. Als frühe Effekte konnten eine signifikante EROD-Induktion und Lipidakkumulation bei hoher SP-MA Aktivität festgestellt werden. Die fortgeschrittene Schädigung war durch eine signifikante Erniedrigung der SP-Aktivität gekennzeichnet. Ab diesem Schädigungsgrad (Abb. 3.14. (1)) kann aus verschiedenen Gründen von einer Gefahr für die individuelle Gesundheit ausgegangen werden: Eine herabgesetzte Immunabwehraktivität birgt die Gefahr von gesteigerter Infektionsanfälligkeit und eine Lysosomenmembranstabilität von weniger als 10 Minuten Destabilisationszeit ist ein Anzeichen für irreversible Leberschädigung (Köhler et al., 2002). Im weiteren Verlauf der Schädigung reagierten die parasitologischen Parameter mit einer Massenvermehrung von *Trichodina*, was eine Folge der herabgesetzten Immunabwehr darstellen kann, und mit einem Rückgang der Parasitendiversität- ein potentieller Indikator für eine Schädigung des gesamten Ökosystems. Als weitere Anzeichen der extremen Schädigung kam es zu einer Abnahme von Enzymaktivitäten (EROD) als Folge eines gestörten Zellmetabolismus und zu einer hohen Variabilität in der Antwort aller gemessenen

Biomarker, da die Homöostase der Zellen bereits in einigen Individuen nicht mehr aufrecht gehalten werden konnte.

Für die Flunder in der Nordsee und *Siganus rivulatus* im Roten Meer wurden Grenzwerte für die einzelnen untersuchten Parameter, insbesondere der "Schlüsselfunktionen" (blaue Kästen) für die verschiedenen Schädigungsgrade berechnet. Für die Meeräschen im Mittelmeer war dies aufgrund der hohen Prävalenz von Leberinfektionen, insbesondere auf der Referenzstation nicht uneingeschränkt möglich, da nicht genug zweifelsfrei nicht infizierte Fische untersucht werden konnten.

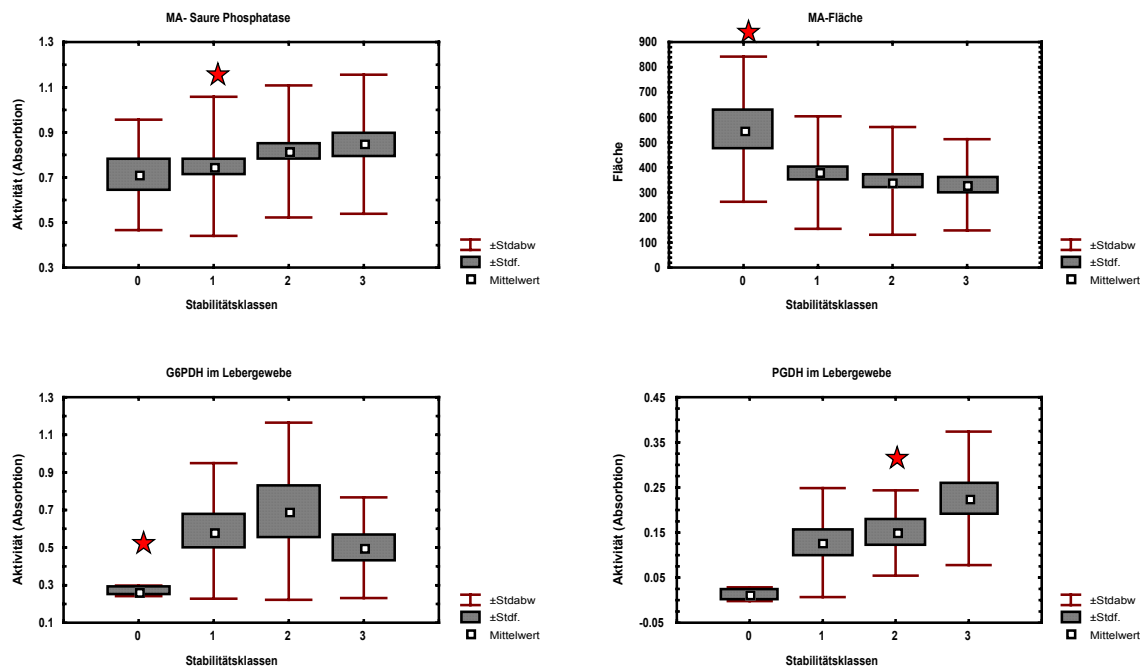


Abb. 3.15.: Biomarkerdaten, gruppiert nach Lysosomenstabilitätsklassen (Kaninchenfische/ Rotes Meer). Der rote Stern markiert den ersten signifikanten Anstieg/Abfall gegenüber dem Referenzwert (Klasse 3) (Kruskal-Wallis ANOVA).

Im Gegensatz zur Flunder konnte in den Kaninchenfischen keine Akkumulation von Neutallipiden in der Leber mit steigendem Schädigungsgrad festgestellt werden. Die Reaktion der Sauren Phosphatase in Makrophagen Aggregaten hingegen entsprach der in der Flunder beobachteten, wenn auch auf einem höheren "Aktivitätsniveau" (Abb. 3.15). Wie bei der Flunder kam es auch in den Kaninchenfischen zu einem signifikanten Aktivitätsabfall in der Schädigungsstufe 3. In der Stufe 4 wurde ein signifikanter Anstieg der mittleren Größe von MA ermittelt.

Interessant war die Reaktion der Enzyme des Pentosephosphatzyklus, G6PDH und PGDH in Hepatozyten von *Siganus*. Während die G6PDH am Anfang der Schädigung induziert wurde, um dann in Schädigungsstufe 4 signifikant abzunehmen, fiel die PGDH-Aktivität mit steigender Schädigung relativ linear ab.

In den folgenden Tabellen sind die berechneten Grenzwerte der verschiedenen Biomarker für die einzelnen Schädigungsstufen zusammengestellt.

Tab. 3.12.: Biomarker-Grenzwerte für die einzelnen Schädigungsgrade (Flunder/Nordsee).

Test	Stufe 1/Referenz	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4
Lys. Stab.	≥ 20	< 20 > 10	10-5	< 5
MA-SP	> 0,45	> 0,45	< 0,45	< 0,45
EROD	< 0,3	> 0,3	> 0,3	hohe Variabilität
Lipidakkumulation	< 2	2-3	2-3	> 3

Tab. 3.13.: Biomarker-Grenzwerte für die einzelnen Schädigungsgrade (*S. rivulatus*/Rotes Meer).

Test	Stufe 1/Referenz	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4
Lys. Stab.	≥ 20	< 20 > 10	10-5	< 5
MA-SP	> 0,8	> 0,8	< 0,8	< 0,8
EROD	< 0,3	> 0,3	> 0,3	
PGDH/ Gewebe	> 0,2	0,2-0,1	0,2-0,1	< 0,1

#### Der „Health-Assessment-Index“ (HAI)

Um die einzelnen Grenzwerte in eine gemeinsame Auswertung einbeziehen zu können, muss mit einem Index gearbeitet werden. Angelehnt an den Health Assessment Index (HAI) (Adams et al., 1993) ist es möglich, jedem Parameterwert je nach der Einordnung in die verschiedenen Schädigungsstufen einen nominalen Wert zuzuteilen (Stufe 1=10, Stufe 2= 20, Stufe 3= 30, Stufe 4= 40). Bei Werten wie zum Beispiel EROD 0,6, der nicht zu einer Stufe, sondern zu zwei verschiedenen Stufen zugeordnet werden kann, wird ein Mittelwert dieser beiden Stufen gebildet, also 25. Durch dieses Vorgehen wird auf mögliche Variabilitäten der jeweiligen Biomarker in gewissen Bereichen Rücksicht genommen

Beispiel:

		INDEX-WERT
Lysosomenstabilität	15	20
EROD	0,5	25
MA-SP	0,4	30
Lipid	2	25
		-----
		25

In diesem Fall würde sich ein HAI-Wert von 25 für diese Tier ergeben, was einer Einordnung zwischen Schädigungsgrad 2 und 3 entspricht.

Wendet man diesen Index basierend auf: Lysosomenstabilität, EROD, Lipidakkumulation und MA-SP an, so beinhaltet er sowohl Frühwarnsysteme (EROD), als auch 2 Systeme, die relativ linear über die Schädigungsstufen reagieren (Lys und Lipidakkumulation) und einen späten Parameter (MA-SP).

Für die Jahre 1995 bis 2000 ergab sich folgendes Bild für die Deutsche Bucht (Abb. 3.16):

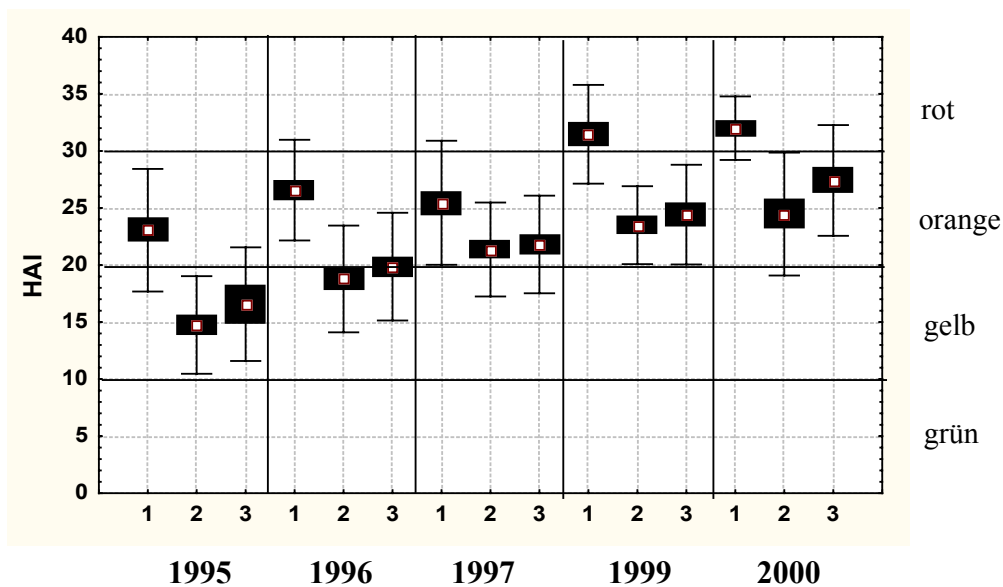


Abb. 3.16.: Berechnung des HAI auf Basis der Herbstprobennahmen 1995-2000 von Flundern aus drei Stationen in der Deutschen Bucht. 1=Elbe, 2=Außeneider, 3=Tiefe Rinne/Helgoland

Deutlich zu erkennen war eine permanente Verschlechterung des Umweltzustandes von 1995 bis 2000. Während 1995 sowohl Außeneider, als auch Tiefe Rinne im nur leicht gestörten "gelben Bereich" der Stufe 2 lagen, waren sie ab 1997 in der Stufe 3 -mittlere Belastung- zu finden. Auch die Elbe verschlechterte sich um eine Stufe: 1999 und 2000 waren Elbeflundern in der höchsten Schädigungsklasse zu finden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe dieser hier dargestellten Effekte deutliche Aussagen darüber möglich waren, bis zu welchem Maße die Schädigung des biologischen Systems fortgeschritten ist und dass die Immunantwort an einer zentralen Schlüsselposition für die Interpretation dieser Effekte steht.

## Kapitel 4

### Funktionen der Makrophagen Aggregate als Marker für Immunmodulation im integrierten biologischen Effektmonitoring -Mittelmeer und Rotes Meer

#### Charakterisierung der untersuchten Stationen

##### Mittelmeer

Im Mittelmeer wurden Meeräschen (*Liza aurata*) auf zwei unterschiedlich stark anthropogen belasteten Stationen an der israelischen Küste gefangen. Die erste Station in der Bucht von Haifa ist durch industrielle Einflüsse stark belastet (Herut et al., 1999, Kress et al., 1999).

Sedimentanalysen zeigten eine höhere Schwermetallbelastung der Bucht von Haifa (Kishon), mit Ausnahme von Quecksilber, das auf beiden Stationen unter der Nachweisgrenze lag (Tab. 4.1). Die Cadmiunkonzentration war im Sediment von Haifa annähernd 20 mal höher, als auf der Referenzstation Maagan Michael, Blei 6 mal höher. Die Kupferkonzentrationen waren auf beiden Stationen vergleichbar.

Die analysierten chlororganischen Pestizide sind in der folgenden Tabelle nur auszugsweise dargestellt. Außer diesen Pestiziden wurden: HCB, HCH- Isomere, OCS, sowie PCB 52 und 101 analysiert. Die Konzentrationen dieser Stoffe lagen im Sediment beider Stationen unter der Nachweisgrenze.

Unterschiede in der Sedimentbelastung wurden nur für die unten aufgeführten Stoffe ermittelt, wobei in den meisten Fällen in der Bucht von Haifa höhere Konzentrationen gemessen wurden, als in Maagan Michael. Eine Ausnahme stellten o,p'-DDE und DDT, sowie Dieldrin dar, die allerdings in Maagan Michael nur knapp über der Nachweisgrenze lagen (Tab. 4.1.). In der Bucht von Haifa hingegen wurden zum Teil stark erhöhte p,p'-DDT Konzentrationen gemessen (20 mal höher). Außerdem lagen die PCB Konzentrationen über denen der Referenzstation.

Tab. 4.1.: Sedimentrückstände ausgewählter Schwermetalle (mg/kg Trockengewicht) und chlororganischer Kohlenwasserstoffe auf den beprobten Mittelmeerstationen.

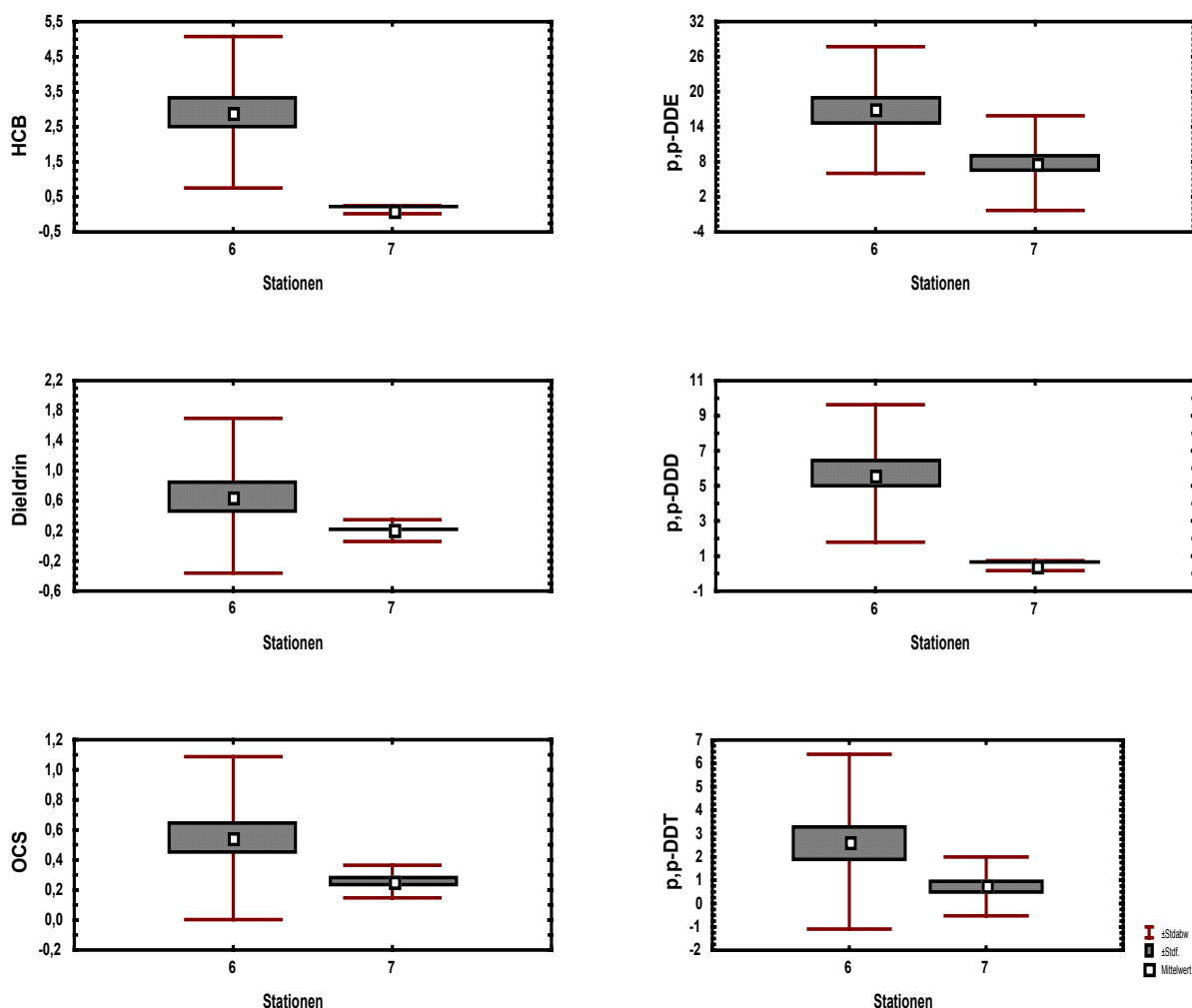
Station	Datum [tt/mm/jj]	Hg	Cd	Cu	Pb
Haifa	12.11.00	< 0.02	0.74	6.5	17
Ma'agan Michael	14.11.00	< 0.02	0.04	5.3	2.6

Station	Datum [tt/mm/jj]	p,p'-DDE	p,p'-DDD	p,p'-DDT	o,p'-DDE	o,p'-DDD	o,p'-DDT	Dieldrin	PCB 28	PCB 118	PCB 138	PCB 153
Haifa	12.11.00	0.9	0.9	7.8	< 0.2	< 0.3	< 0.2	< 0.1	0.2	0.2	0.5	0.3
Ma'agan Michael	14.11.00	< 0.1	< 0.2	< 0.2	< 0.2	0.4	0.2	0.1	< 0.2	0.2	0.3	< 0.3

Mehr Aufschluß über die individuelle Belastungssituation der Fische ergab die Rückstandsanalyse von ausgewählten Schadstoffen in der Leber der untersuchten Meeräschen. Da diese aber für die Untersuchung biologischer Effekte fixiert werden musste, wurde als eine Ausweichmöglichkeit auf die rückstandsanalytische Untersuchung des Fischmuskels zurückgegriffen.

Hier waren die Unterschiede zwischen den Stationen schon wesentlich deutlicher, als anhand der Sedimentbelastung zu erkennen war (Abb. 4.1).

Da zwischen männlichen und weiblichen Fischen bei den untersuchten Schadstoffen keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Rückstände im Muskel ermittelt wurden, werden männliche und weibliche Meeräschen im Weiteren gemeinsam dargestellt.



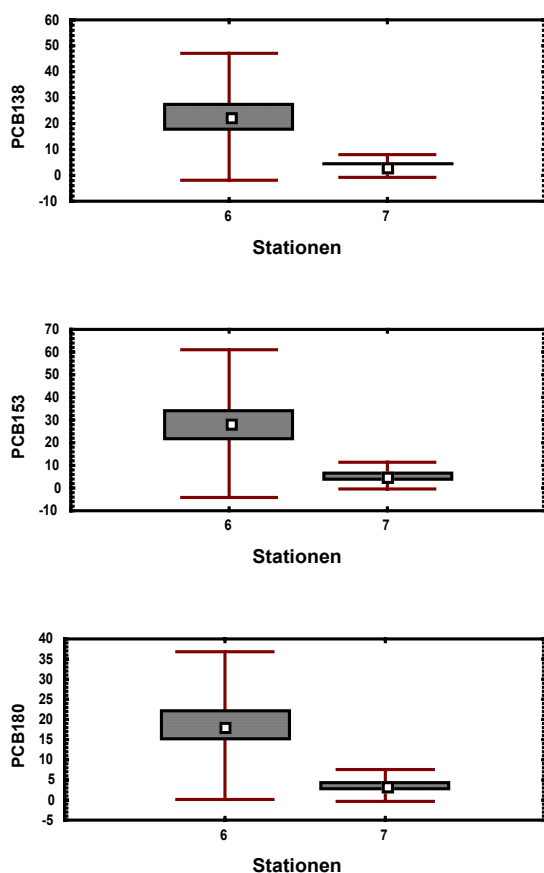


Abb. 4.1.: Rückstandsanalytische Untersuchungen im Muskel von Meeräschen von zwei unterschiedlich belasteten Stationen an der israelischen Mittelmeerküste ( $\mu\text{g/kg}$  Frischgewicht). Station 6= Bucht von Haifa, Station 7= Maagan Michael, Standardabweichungen und Mittelwerte.

Bei den chlororganischen Kohlenwasserstoffen wurde in allen Fällen eine signifikant höhere Konzentration in den Meeräschen aus der Bucht von Haifa gemessen. Anders war das Bild bei den Schwermetallrückständen im Muskel. Für Kupfer wurden höhere Konzentrationen in den Fischen der Referenzstation gemessen (Abb. 4.2), der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant.

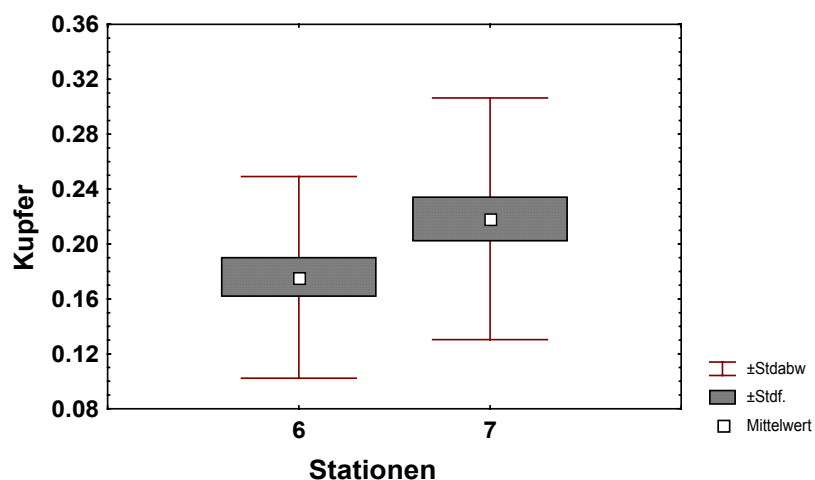


Abb. 4.2.: Rückstände von Kupfer im Muskel von Meeräschen von zwei unterschiedlich belasteten Stationen an der israelischen Mittelmeerküste ( $\text{mg/kg}$  Frischgewicht). Station 6= Bucht von Haifa, Station 7= Maagan Michael.



### Rotes Meer

Im Roten Meer wurden Kaninchenfische von drei Stationen untersucht, die in einem sehr engen Bereich (8 km) beieinander lagen. Charakterisiert werden diese drei Bereiche durch ihre unterschiedliche Nutzung. Die erste Station (8) ist eine intensiv genutzte marine Fischfarm an der Grenze zu Jordanien mit hohem anthropogenen Eintrag. Hier handelt es sich insbesondere um organische Futtermittel, von denen sich auch die wildlebenden Fische bevorzugt ernähren. So zeichnen sich die in diesem Gebiet gefangenen Kaninchenfische durch einen hohen Konditionsfaktor und eine hohe Lipidakkumulation in der Leber aus. Zum Anderen werden hier auch andere, pharmakologische wirksame Substanzen als Medikamente für die Farmfische in die marine Umwelt eingetragen. Diese Station 8 gilt aus den oben genannten Gründen als "belastet".

Die zweite Station (9) ist ein sandiger Bereich, der intensiv touristisch genutzt wird. Dort an der "North Beach" von Eilat befinden sich die großen Hotels und Badstrände der Stadt. Auch dieser Bereich gilt als "belastet".

Die dritte Station ist ein Korallenriff und befindet sich dicht an der ägyptischen Grenze. Hier liegt ein Unterwasser-Observatorium und ein angeschlossenes großes Aquarium. Unbeeinflusst ist auch diese Station nicht, gilt aber als das Referenzgebiet des israelischen Teiles des Golf von Aquaba.

Die Rückstandsanalytischen Untersuchungen der Sedimente zeigten folgende Belastungssituationen (Abb. 4.3): Bei den Schwermetallen im Sediment ergab sich ein nahezu einheitliches Bild. Bis auf Kupfer und Nickel zeigte sich ein Belastungsgradient mit höchsten Schwermetallkonzentrationen im Sediment der Fischfarm, gefolgt von North Beach und dem Unterwasser-Observatorium. Die höchsten Kupferkonzentrationen wurden im Sediment von North Beach gemessen, während die Nickelrückstände auf allen drei Stationen nahezu identisch waren.

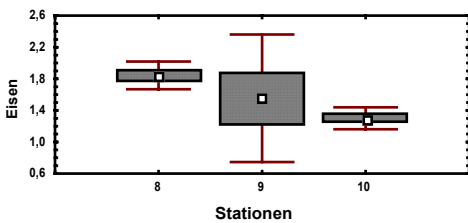
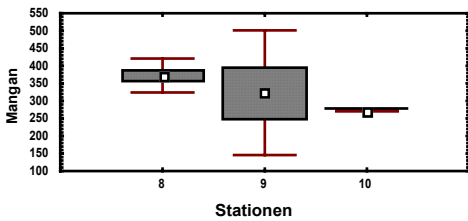
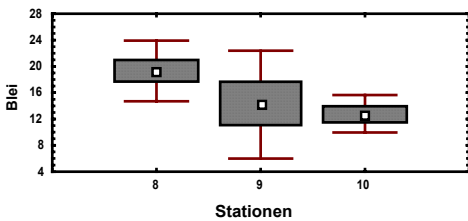
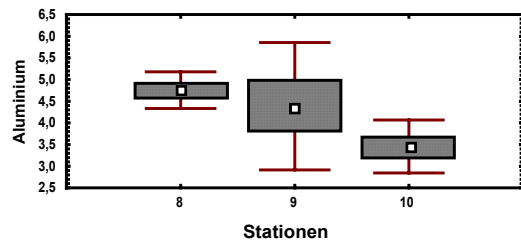
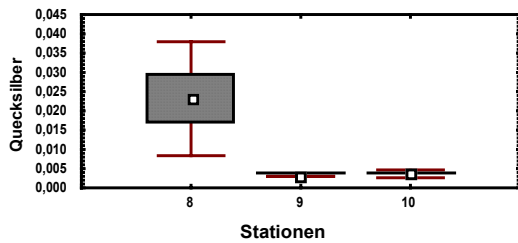
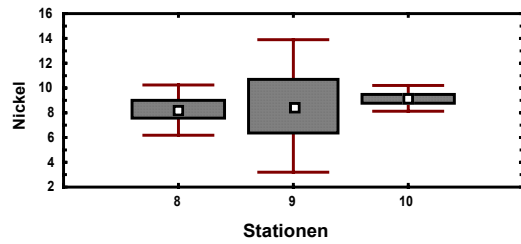
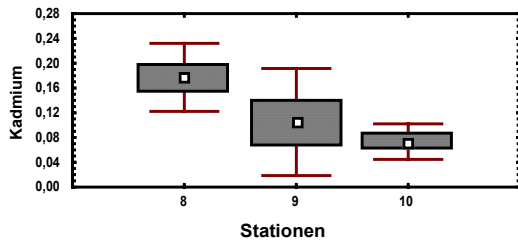
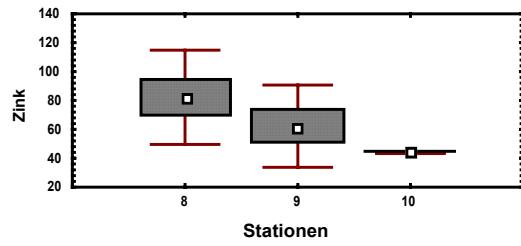
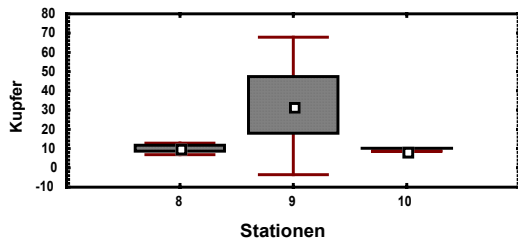


Abb. 4.3.: Schwermetallbelastung der Sedimente von 3 Stationen im israelischen Teil des Golfes von Aquaba in mg/kg Trockengewicht. 8= Ardag/Fischfarm, 9= North Beach, 10= Unterwasser-Observatorium. Mittelwerte und Standardabweichungen.

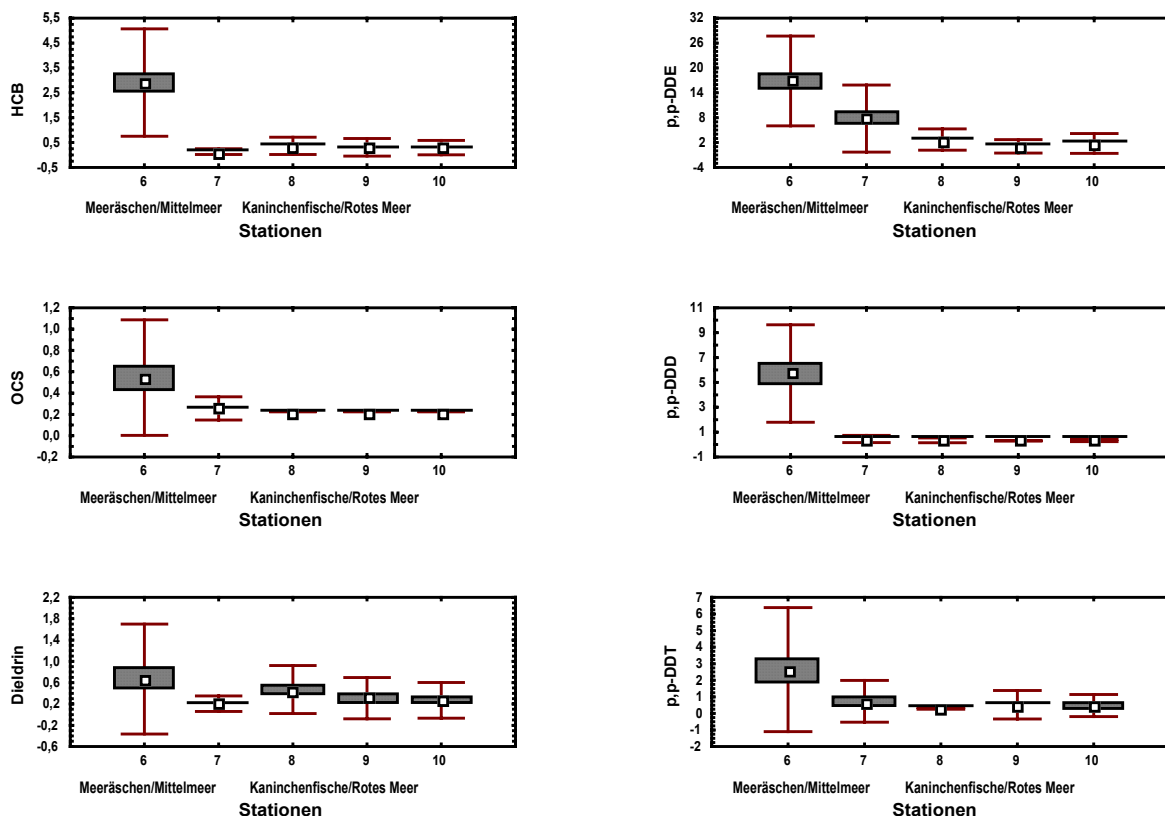
Tabelle 4.2. zeigt die Rückstände von Chlorkohlenwasserstoffen, die in den Sedimenten der drei beprobten Stationen meßbar waren, das heißt, über der Nachweisgrenze lagen. Alle anderen CKWs wie die HCH-Isomere, OCS, Dieldrin, p,p-DDD, o,p-DDE/DDD/DDT und alle PCBs lagen auf allen Stationen unter der Nachweisgrenze. Übrig blieben allein HCB, nachweisbar im Sediment der North Beach, p,p-DDE, nachweisbar, aber nur im Bereich der Nachweisgrenze im Sediment der Fischfarm und des Observatoriums und p,p-DDT im Sediment der Fischfarm.

Tab. 4.2.: Rückstände von Organochlorverbindungen (mg/kg Trockengewicht) im Sediment dreier Stationen im Roten Meer.

Station	Datum	HCB	p,p	p,p
Ardag/Fischfarm	11.99	< 0.1	0.1	1.3
North Beach	11.99	0.4	< 0.1	< 0.2
Observatorium	11.99	< 0.1	0.1	< 0.2

Diese Ergebnisse fanden ihre Entsprechung in den Rückstandskonzentrationen der untersuchten Kaninchenfische.

Um deutlich zu machen, wie sich die Konzentrationen von CKW im Muskelgewebe der Kaninchenfische, verglichen mit den Meeräschen aus dem Mittelmeer verhielten, wurden in Abb. 4.4. beide Arten gemeinsam dargestellt.



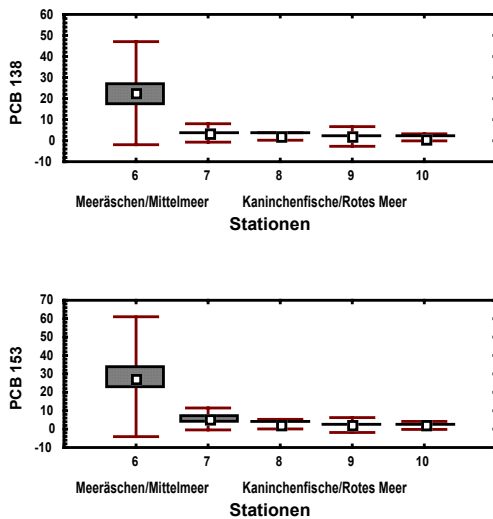


Abb.4.4.: Rückstandsanalytische Untersuchung von CKW im Muskel von Meeräschen aus dem Mittelmeer (6/7) und Kaninchenfischen aus dem Roten Meer (8/9/10), Angaben in µg/kg Frischgewicht. Mittelwerte und Standardabweichungen.

Stationen:

6=Mittelmeer/Haifa- belastet

7=Mittelmeer/Maagan Michael- Referenz

8=Rotes Meer/Fischfarm

9=Rotes Meer/North Beach

10=Rotes Meer/Observatorium

Für die Rückstände der DDT Metabolite im Muskel wurde festgestellt, dass sich die Konzentrationen in Fischen aus dem Roten Meer auf dem Niveau der Meeräschen von der Referenzstation im Mittelmeer befinden (DDD), oder sogar darunter (DDE, DDT). Die Unterschiede der Belastung zwischen den einzelnen Stationen im Roten Meer waren bei dieser Stoffgruppe gering.

Gleiches galt für die PCB Kongenere 138 und 153.

Während HCH auf allen Stationen im Golf von Aquaba höher lag, als auf der Referenzstation im Mittelmeer, war OCS in den Fischen im Roten Meer nicht nachzuweisen. Dielrinkkonzentrationen lagen zwischen den Werten der belasteten Mittelmeertiere und den Referenztieren aus dem Mittelmeer. Für diesen Schadstoff konnte in den Kaninchenfischen im Roten Meer ein Belastungsgradient mit höchsten Konzentrationen in den Fischen von der Fischfarm, gefolgt von North Beach und dem Observatorium ermittelt werden.

### *Einfluss der Schadstoff-Belastungssituation auf immunologische und physiologische Parameter*

#### *Organochlorverbindungen*

Um eine Aussage treffen zu können, inwieweit sich die unterschiedliche individuelle Belastungssituation der einzelnen Meeräschen aus dem Mittelmeer und der Kaninchenfische aus dem Roten Meer auf die gemessenen physiologischen Parameter auswirkt, wurden die Fische je nach Schadstoffgehalt in vier Gruppen unterteilt.

Die Unterteilung wurde anhand der Rückstandskonzentration von PCB 153 im Muskel der Fische vorgenommen. Dieser Schadstoff wurde von mehreren Autoren als eine Indikatorschadstoffsubstanz für generelle Belastung genutzt (Johnson et al., 2000, Bjoerk und Gilek, 1999, Machala et al., 1998).

Die Einstufung wurde folgendermaßen vorgenommen:

<i>Gruppe 0</i>	PCB 153 unterhalb der Nachweisgrenze (kam in den untersuchten Mittelmeerfischen nicht vor).
<i>Gruppe 1</i>	Bis 10 µg PCB 153 / kg Frischgewicht.
<i>Gruppe 2</i>	> 10- 30 µg PCB 153 / kg Frischgewicht.
<i>Gruppe 3</i>	> 30 µg PCB 153 / kg Frischgewicht (kam in den untersuchten Kaninchenfischen aus dem Roten Meer nicht vor).

In der Gruppe 3 (Mittelmeer/*Liza aurata*) wurden PCB 153 Werte von bis zu 155,4 µg/kg Frischgewicht gemessen.

In Mugiliden von den beiden Mittelmeerstationen wurde in jedem untersuchten Fall, also auch in den Fischen von der Referenzstation PCB 153 nachgewiesen. Da kein Tier unter der Nachweisgrenze lag, gibt es für dieses Untersuchungsgebiet keine Gruppe 0.

Bei den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer hingegen fiel die Gruppe 3 weg, da PCB 153-Werte über 30 µg/kg Frischgewicht nicht gemessen wurden. Im Mittelmeer kann man also von einer mehr oder weniger hohen Dauerbelastung der Fische sprechen, im Roten Meer dagegen konnte die Stufe des Belastungsbeginns untersucht werden (Unterschiede zwischen Fischen, deren Belastung unter der Nachweisgrenze lag und gering belasteten Fischen).

#### Konditionsfaktor/ Lebersomatischer Index (Abb. 4.5.)

Der Konditionsfaktor in Mugiliden aus dem Mittelmeer zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der gering und der mittelmäßig belasteten Gruppe (Kruskal-Wallis Test,  $p < 0,01$ ). Er fiel von einem Mittelwert von über 1,45 in der gering belasteten Gruppe auf unter 1,35 in der Gruppe zwei, um danach in den stark belasteten Meeräschen der Gruppe 3 wieder anzusteigen.

In den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer konnte eine signifikante Erhöhung des Konditionsfaktors bei einsetzender Belastung (zwischen Gruppe 0 und 1) festgestellt werden ( $p < 0,05$ ).

Der lebersomatische Index (LSI) erhöhte sich in den Meeräschen aus dem Mittelmeer von Belastungsstufe zu Belastungsstufe signifikant ( $p < 0,01$ ). In den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer wurde ebenfalls eine Erhöhung des LSI bei einsetzender Belastung ermittelt, diese war aber nicht statistisch signifikant.

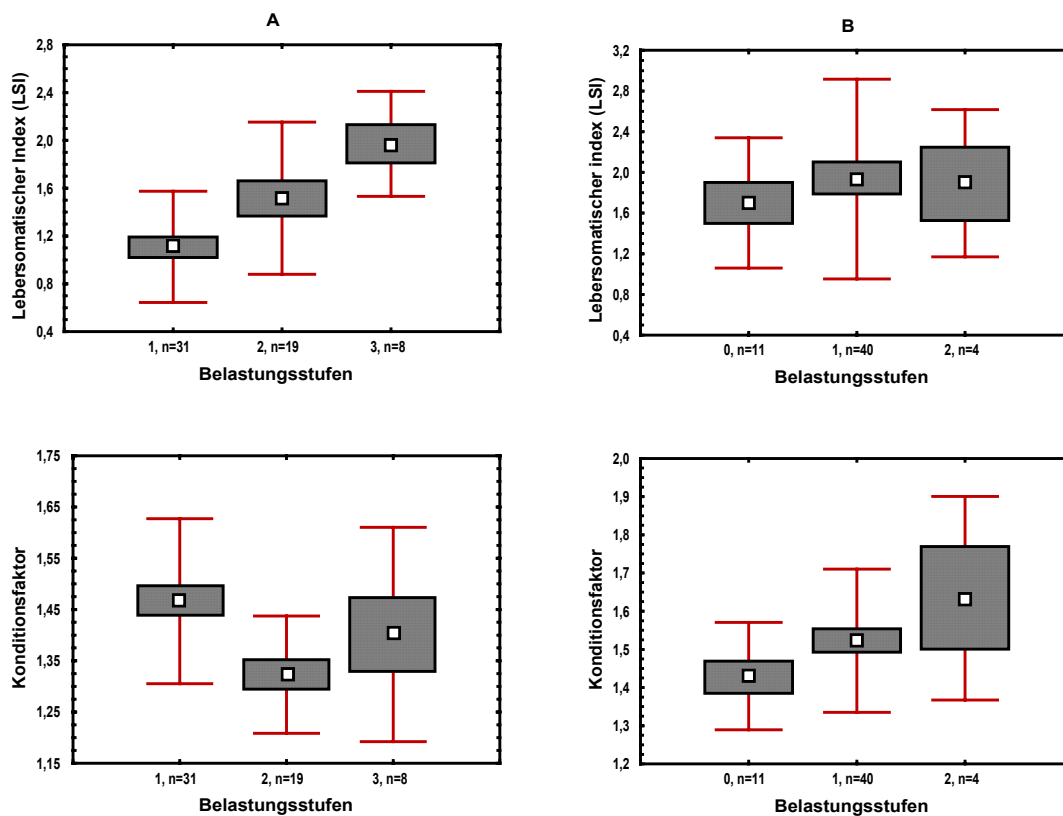


Abb. 4.5.: Lebersomatischer Index und Konditionsfaktor von Mugiliden aus dem Mittelmeer (A) und Kaninchenfischen aus dem Roten Meer (B), bezogen auf den Grad der Belastungssituation. Gruppen gebildet nach Gehalt an PCB 153 Rückständen im Fischmuskel. Mittelwerte und Standardabweichungen.

#### Biotransformation (Abb. 4.6.)

Unter Biotransformation wurden zwei Entgiftungsenzymssysteme gefasst: die Aktivität der CYP1A1 EROD und die Aktivität der Aldehyddehydrogenase.

In Meeräschen aus dem Mittelmeer wurde eine hochsignifikante Induktion der CYP1A1 bei steigender Belastung festgestellt (zwischen Stufe 1 und 2, Kruskal-Wallis Test  $p < 0,01$ ). In der höchsten Belastungsstufe (3) ging die EROD Aktivität wieder zurück, die Abnahme war allerdings nicht statistisch signifikant und im Vergleich zu der gering belasteten Gruppe war die Aktivität immer noch signifikant erhöht.

In den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer wurde zwischen den Gruppen nicht belastet (0) und gering belastet (1) kein Unterschied in der EROD Aktivität festgestellt. Mit steigender Belastung (2) kam es allerdings auch in dieser Fischart zu einer signifikanten Induktion der Enzymaktivität.

Die Aldehyddehydrogenase zeigte in beiden Fischarten eine Aktivitätssteigerung mit wachsender Belastung. Diese Steigerung, das heißt die Unterschiede zwischen den einzelnen Belastungsstufen war in den Meeräschen aus dem Mittelmeer allerdings nicht statistisch signifikant. In den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer dagegen kam es beim Übergang von der geringen zur mittleren Belastungssituation (1-2) zu einer signifikanten Erhöhung der Enzymaktivität (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,01$ ).

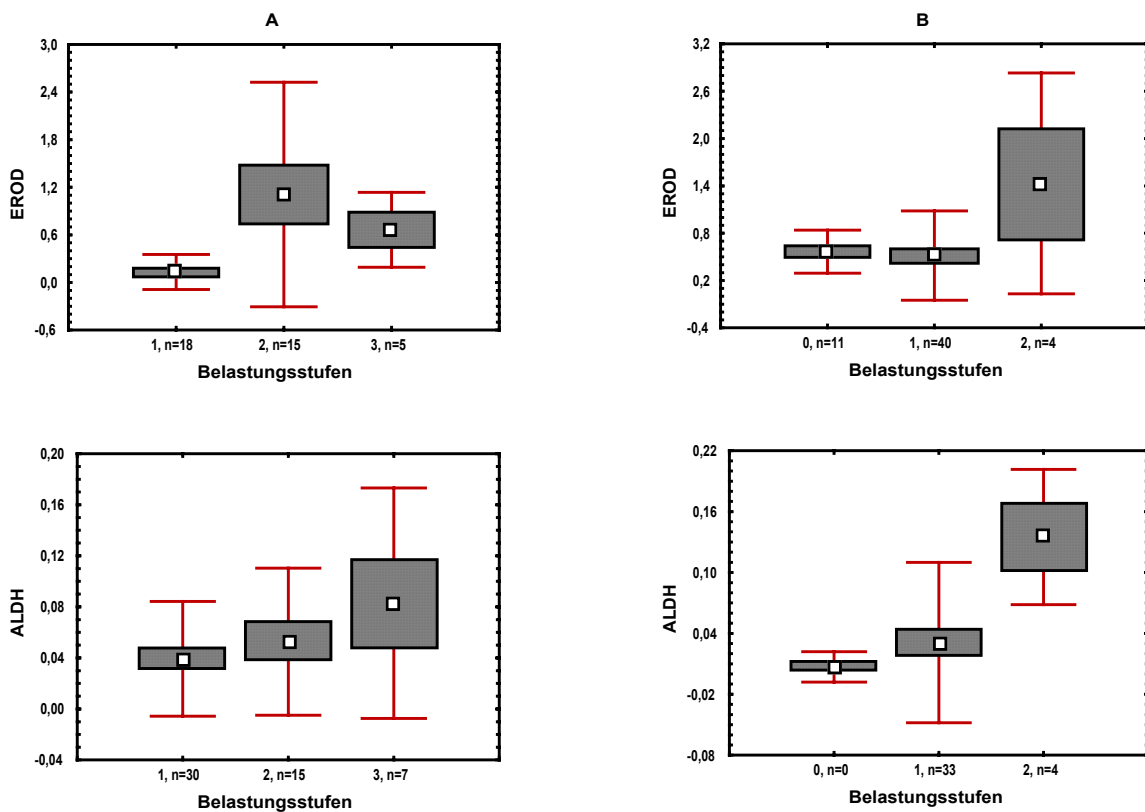


Abb. 4.6.: EROD und ALDH Aktivität in Mugiliden aus dem Mittelmeer (A) und Kaninchenfischen aus dem Roten Meer (B), bezogen auf den Grad der Belastungssituation. Gruppen gebildet nach Gehalt an PCB 153 Rückständen im Fischmuskel. Mittelwert und Standardabweichungen.

#### Reaktionen des Leberparenchyms (Abb. 4.7.)

Um beurteilen zu können, in welchem Grade die Biomarker im Leberparenchym auf verschiedene Belastungsgrade in den zwei Fischarten reagierten, wurden neben der Lysosomenmembranstabilität auch die Aktivität der beiden für den Lebermetabolismus zentralen Enzyme G6PDH und PGDH untersucht.

Die Meeräschen aus dem Mittelmeer zeigten eine kontinuierliche Abnahme der Lysosomenstabilität mit zunehmender Belastung. Sowohl die Abnahme zwischen der gering belasteten Gruppe 1 und der mittleren Gruppe 2, als auch die Abnahme zwischen mittlerer und hoher Belastung waren statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,05$ ). Vergleicht man die Lysosomenstabilität in den gering belasteten Fischen mit derjenigen der hoch belasteten, so ist der Unterschied hochsignifikant (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,001$ ). Bei den Kaninchenfischen im Roten Meer wurde der Unterschied zwischen den nicht belasteten Fischen (Belastung unter der Nachweisgrenze) und den gering belasteten Siganiden untersucht. Auch hier zeigte sich bereits in diesem Stadium relativ geringen Schadstoffeinflusses (zwischen Gruppen 0 und 1) eine signifikante Herabsetzung der Lysosomenstabilität (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,05$ ). Mit weiter steigender Belastung (2) ging die Stabilität weiter herunter, für einen statistischen Vergleich war diese Gruppe allerdings zu klein ( $n=4$ ). Außerdem setzte sich die Belastungsgruppe 2 im Roten Meer aus Fischen zusammen, die nur im mittleren Bereich der Gruppe 2 lagen (bis höchstens  $19,6 \mu\text{g/kg}$  PCB

153). Aus diesem Grunde waren die Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 2 im Roten Meer nicht so deutlich.

Die Aktivität der G6PDH stieg in den Meeräschen aus dem Mittelmeer von geringer zu mittlerer Belastung signifikant (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,05$ ), um dann zwischen mittlerer und hoher Belastung wieder signifikant abzunehmen.

Bei den Kaninchenfischen im Roten Meer blieb die G6PDH-Aktivität konstant. Aber auch hier gilt die oben erwähnte Tatsache, dass nur die ersten beiden Gruppen statistisch berücksichtigt werden konnten, also der Unterschied zwischen nicht- und gering belasteten Fischen. Hier kam es zu keiner belastungsbedingten Induktion oder Inhibierung der G6PDH.

Bei der PGDH änderte sich die Enzymaktivität in den Meeräschen aus dem Mittelmeer zwischen gering und mittelmäßig belasteten Fischen nicht. In der hochbelasteten Gruppe kam es allerdings zu einer signifikanten Abnahme der Enzymaktivität, verglichen mit den gering belasteten Fischen (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,05$ ).

In den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer war eine Abnahme der Enzymaktivität zwischen der nicht belasteten Gruppe und den gering belasteten Fischen zu vermerken, die allerdings nicht statistisch signifikant war.

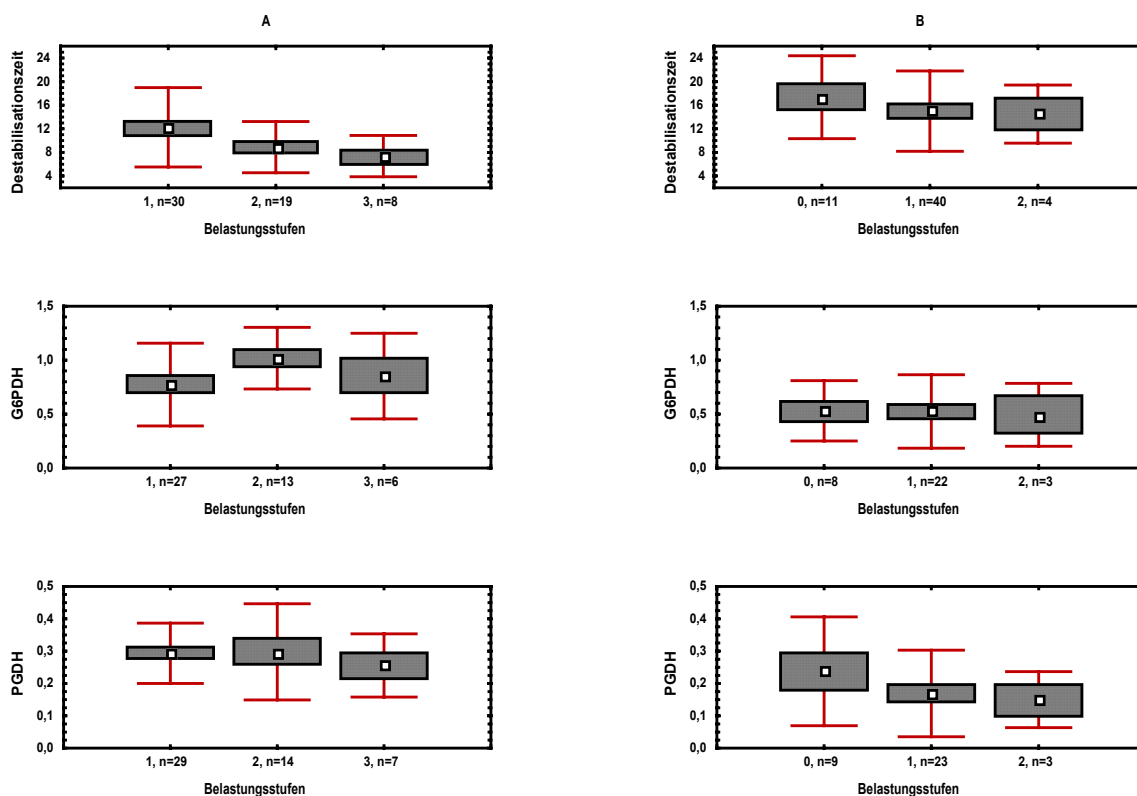


Abb. 4.7.: Lysosomenstabilität, G6PDH- und PGDH-Aktivität in Mugiliden aus dem Mittelmeer (A) und Kaninchenfischen aus dem Roten Meer (B), bezogen auf den Grad der Belastungssituation. Gruppen gebildet nach Gehalt an PCB 153 Rückständen im Fischmuskel. Mittelwert und Standardabweichungen.



#### Makrophagenparameter und Belastungssituation (Abb. 4.8.)

Neben den routinemäßig in dieser Studie untersuchten Parametern Makrophagenaggregat-Aktivität (MA-SP), Mittlere Größe der Aggregate und mittlere Anzahl, wurde auch die Aktivität dreier Schlüsselenzyme des Makrophagenmetabolismus untersucht: NOS, G6PDH und PGDH.

Die mittlere Anzahl von Makrophagen Aggregaten (pro mm<sup>2</sup>) ging in Meeräschen aus dem Mittelmeer im Übergang zwischen geringer und mittlerer Belastung hochsignifikant zurück (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,01$ ), stieg dann aber leicht wieder an in der Gruppe der hoch belasteten Fische. Insgesamt war die Anzahl der Aggregate allerdings sowohl in der mittleren, als auch in der hoch belasteten Gruppe signifikant niedriger, als in der gering belasteten.

Bei der Größe wurde eine kontinuierliche Größenabnahme beobachtet. Der Unterschied zwischen gering belasteten und hoch belasteten Fischen war statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,05$ ).

Bei den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer wurde ebenfalls eine Abnahme der mittleren Größe der Aggregate von den nicht belasteten Individuen zu den gering belasteten ermittelt, diese war allerdings nicht statistisch signifikant. Danach (zwischen Gruppe 1 und 2) kam es zu einer Vergrößerung der Zentren. Diese Ergebnisse sind zumindest in der Belastungsgruppe 2, aufgrund der niedrigen Individuenzahl ( $n=4$ ), kritisch zu sehen. Allerdings wurde auch in Flundern aus der Nordsee beobachtet, dass eine belastungsbedingte Herabsetzung der Makrophagen Aggregat Aktivität (MA-SP) mit einer Vergrößerung der Aggregate einher ging (Kapitel 3).

Die Aktivität der Sauren Phosphatase war in Aggregaten der Meeräschen aus dem Mittelmeer in den mittel- und hoch belasteten Fischen hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) niedriger, als in den gering belasteten Artgenossen. In den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer hingegen wurde nur eine geringe Abnahme der Aktivität in den gering belasteten Fischen gegenüber den nicht belasteten festgestellt, die statistisch nicht abgesichert werden konnte.

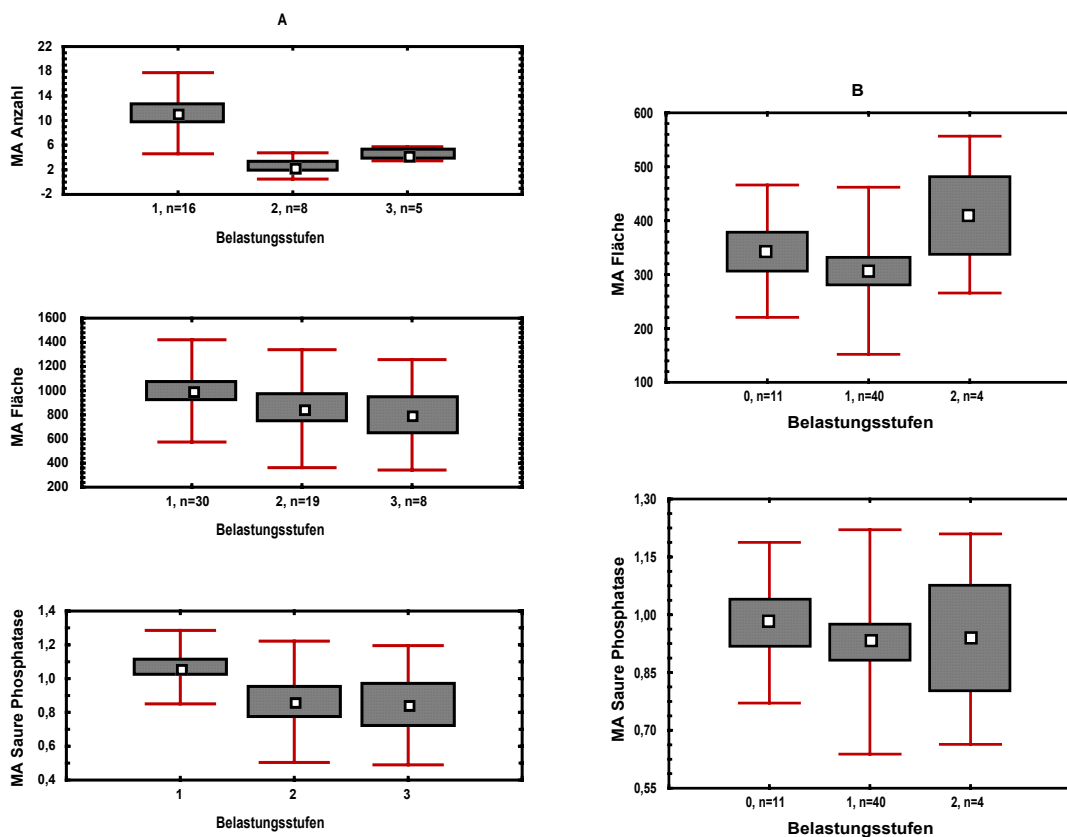


Abb. 4.8.: MA Anzahl, MA Größe und MA Saure Phosphatase Aktivität in Mugiliden aus dem Mittelmeer (A) und Kaninchenfischen aus dem Roten Meer (B), bezogen auf den Grad der Belastungssituation. Gruppen gebildet nach Gehalt an PCB 153 Rückständen im Fischmuskel. Mittelwerte und Standardabweichungen.

#### Aktivität weiterer Schlüsselenzyme in Makrophagen Aggregaten (Abb. 4.9.)

Für alle drei zusätzlich untersuchten Enzyme, die in den Makrophagen Aggregaten der Meeräschen aus dem Mittelmeer gemessen wurden, wurde eine Suppression der Enzymaktivität mit steigender Belastungsstufe festgestellt.

Bei der NOS verlief diese kontinuierlich von geringer zu hoher Belastung, wobei der Unterschied zwischen den gering und den hoch belasteten Fischen statistisch signifikant war ( $p < 0,05$ ). Die Enzymaktivität der PGDH ging gleich im Übergang zwischen geringer und mittlerer Belastung signifikant herunter ( $p < 0,01$ ), fiel dann aber auch zwischen mittel und starker Belastung noch einmal signifikant ab ( $p < 0,05$ ). Bei diesem Enzym zeigte sich die Suppression also besonders deutlich.

Bei der Aktivität der G6PDH war ein Abfall der Enzymaktivität erst zwischen der mittleren und der starken Belastung zu registrieren ( $p < 0,05$ ).

In den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer wurden die Reaktionen in nicht, beziehungsweise gering belasteten Fischen beobachtet:

bei der NOS wurde ein Anstieg der Enzymaktivität von der nicht belasteten zur gering belasteten Gruppe beobachtet, der aber nicht statistisch signifikant war, bei der PGDH zeigte sich keine Veränderung zwischen den beiden Gruppen, während bei der G6PDH, ebenso wie bei der NOS eine Induktion der Enzymaktivität zu vermerken war.

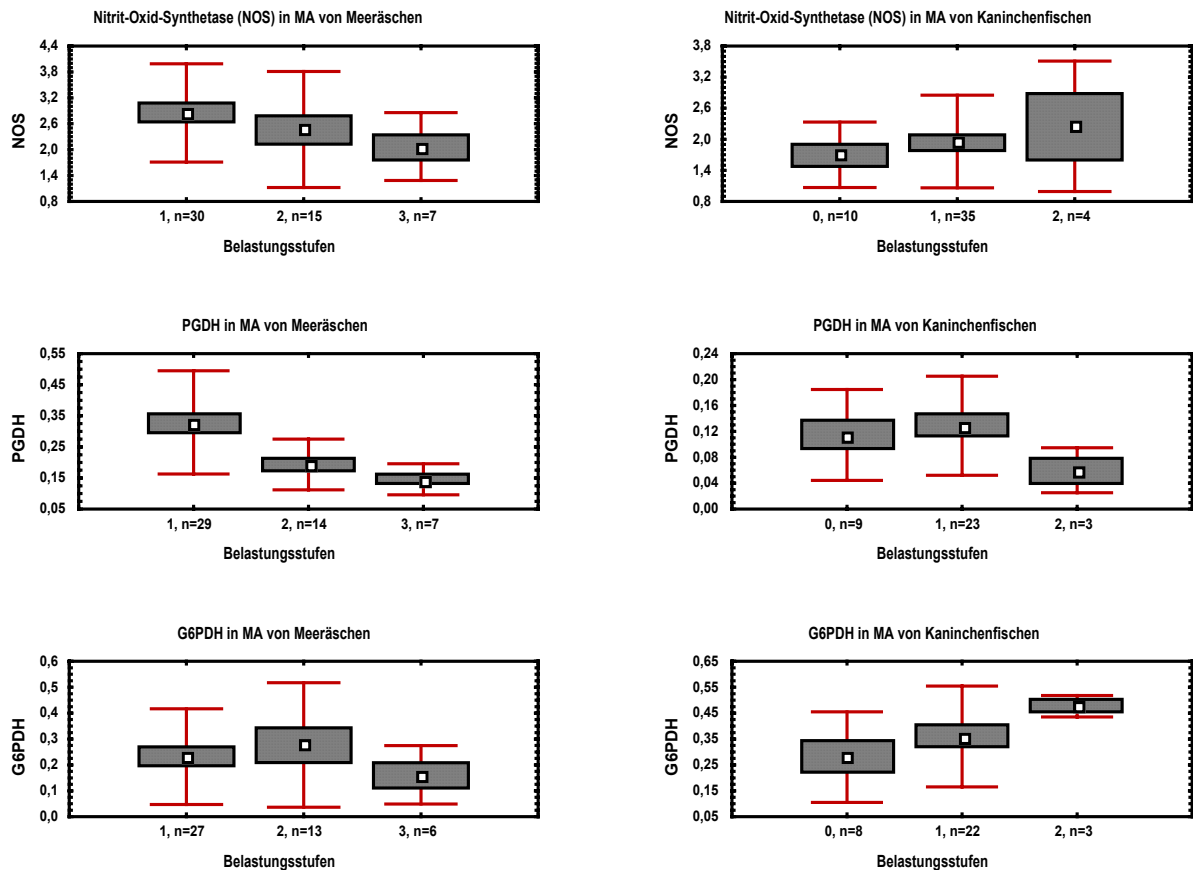


Abb. 4.9.: NOS, PGDH und G6PDH- Aktivität in MA von Mugiliden aus dem Mittelmeer (A) und Kaninchenfischen aus dem Roten Meer (B), bezogen auf den Grad der Belastungssituation. Gruppen gebildet nach Gehalt an PCB 153 Rückständen im Fischmuskel. Mittelwert und Standardabweichungen.

#### Infektionsdruck von Myxosporidien (Abb. 4.10.)

In Mugiliden aus dem Mittelmeer, besonders in den Fischen, die im Referenzgebiet Maagan Michael gefangen wurden, wurde im Verlauf dieser Untersuchungen eine starke Infektion mit Myxosporidien, auch im Lebergewebe festgestellt (siehe Kapitel 5). In diesem Abschnitt wird untersucht, wie sich die unterschiedlichen Infektionsgrade auf die drei verschiedenen Belastungsstufen aufteilen.

Die höchste Infektionsintensität in der Leber der untersuchten Meeräschen wurde in der Gruppe der gering belasteten Fische ermittelt. Diese Infektionsintensität, basierend auf der Diagnostik der Meeräschen (Kapitel 5) war signifikant höher, als in den Mugiliden der mittleren und hohen Belastungsstufe ( $p < 0,05$ ).

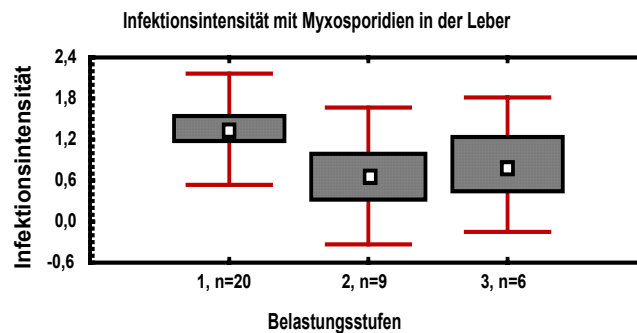


Abb. 4.10.: Myxosporidieninfektion in der Leber von Mugiliden aus dem Mittelmeer, bezogen auf den Grad der individuellen Belastungssituation. Gruppen gebildet nach Gehalt an PCB 153 Rückständen im Fischmuskel. Mittelwerte und Standardabweichungen.

### *Kupfer*

Für die Rückstände von Kupfer im Muskelgewebe der untersuchten Meeräschen wurde eine signifikant negative Korrelation zu den Rückständen von PCB 153 ermittelt, der "Markersubstanz" der chlorierten Kohlenwasserstoffe. Insgesamt waren die Konzentrationen von Kupfer in den analysierten Fischen aller drei Meere höher in den Referenzgebieten, als auf den belasteten Stationen. Besonders auffällig war dies im Mittelmeer. Der Unterschied zwischen den Rückständen in Meeräschen von der Referenzstation Maagan Michael und der belasteten Station Haifa Bay war zwar nicht innerhalb der Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$ , lag aber mit  $p = 0,977$  noch unter einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10%, wobei Fische der Referenzstation die höheren Konzentrationen aufwiesen.

Um zu untersuchen, inwieweit sich die unter Feldbedingungen in den untersuchten Fischen gemessenen Kupferkonzentrationen im Muskelgewebe auf die gemessenen immunologischen und physiologischen Parameter auswirkten, wurde ähnlich wie für die PCB153 Rückstände eine Einteilung in 4 Belastungsgruppen vorgenommen:

<i>Belastungsgruppe 0</i>	< 100 µg Cu/kg Frischgewicht
<i>Belastungsgruppe 1</i>	≥ 100 µg Cu/kg Frischgewicht
<i>Belastungsgruppe 2</i>	≥ 200 µg Cu/kg Frischgewicht
<i>Belastungsgruppe 3</i>	≥ 300 µg Cu/kg Frischgewicht

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 4.11. zusammengefasst.

In Bezug auf die Infektion mit Protozoen in der Leber der untersuchten Meeräschen wurde eine steigende Infektionsintensität mit steigender Konzentration von Kupfer im Muskelgewebe festgestellt, wobei die Steigerung der Infektionsrate mit Kupferkonzentrationen von  $\geq 200$  µg/kg Frischgewicht begann.

Unterschiede in Bezug auf die mittlere Größe der MA wurden zwischen den einzelnen Kupfer-Konzentrationsstufen nicht festgestellt.

Die Aktivität der Sauren Phosphatase in MA nahm entsprechend der Infektionsrate mit steigender Kupferkonzentration zu. Auch dieser Parameter stieg an ab einer Konzentration von  $\geq 200$  mg/kg Frischgewicht (Kupferklasse 2).

Die Aktivität der G6PDH in Makrophagen Aggregaten stieg bereits zwischen den ersten zwei Kupferklassen (<100 mg/kg Frischgewicht und <200 mg/kg Frischgewicht) erheblich an. Dieses Enzym war in Fischen der niedrigsten Kupferkonzentrationsklasse (0) so gut wie inaktiv. In Klasse 1 wurden bereits mittlere Aktivitätswerte von 0,25 gemessen, die sich mit ansteigender Kupferkonzentration im Gewebe noch erhöhten (bis 0,35). Auch im Lebergewebe wurde ein Anstieg der G6PDH mit steigenden Kupferkonzentrationen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde für die PGDH keine Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Kupferklassen, sowohl in Makrophagen Aggregaten, als auch im Lebergewebe festgestellt.

Der deutlichste Zusammenhang wurde zwischen der Aktivität der NOS und der Kupferkonzentration im Muskelgewebe festgestellt. Diese beiden Parameter waren hochsignifikant negativ miteinander korreliert ( $p < 0,001$ ) (Tab. 4.3.).

Auf beiden beprobten Stationen im Mittelmeer wurde eine höhere Infektionsintensität mit *Myxobolus* in der Leber der Fische festgestellt, die hohe Kupferkonzentrationen aufwiesen (Abb. 4.12.). Auf Station 7, deren Fische im Mittel höhere Kupferkonzentrationen im Gewebe hatten, war dieses Ergebnis noch deutlicher, als auf der Station 6, die eigentlich in Hinblick auf die CKW- Rückstände als die belastete Station galt.

Tab. 4.3.: Spearmans Rangkorrelation (isdiss.sta)

	Gültige	Spearman		
	N	R	t(N-2)	p-Niveau
KUPFER & Infektion	56	.203076	1.52406	.133330
KUPFER & MA-Größe	57	-.032913	-.24422	.807971
<b>KUPFER &amp; MA-SP</b>	<b>57</b>	<b>.279345</b>	<b>2.15757</b>	<b>.035346</b>
KUPFER & LYS1	57	.044345	.32920	.743256
KUPFER & LYS2	57	-.169783	-1.27769	.206724
KUPFER & PGDH	50	-.061584	-.42748	.670943
<b>KUPFER &amp; G6PDH</b>	<b>46</b>	<b>.387791</b>	<b>2.79069</b>	<b>.007749</b>
KUPFER & LSI	58	-.158555	-1.20172	.234531
<b>KUPFER &amp; NOS</b>	<b>52</b>	<b>-.464559</b>	<b>-3.70951</b>	<b>.000522</b>
KUPFER & MA-Anzahl	32	.178014	.99085	.329684

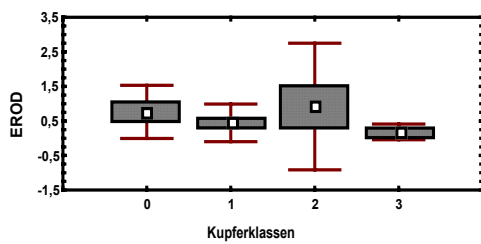
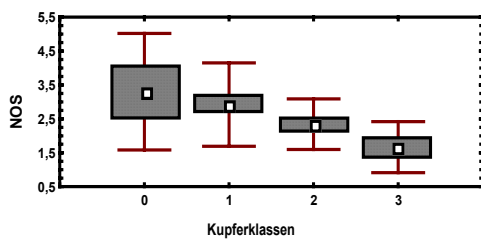
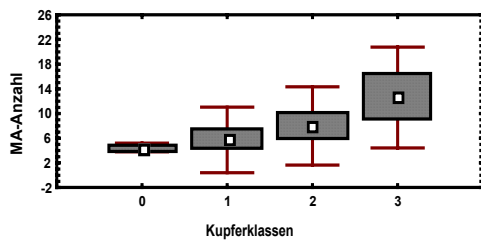
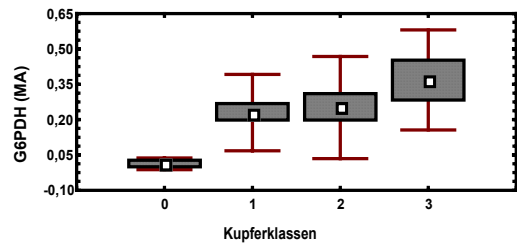
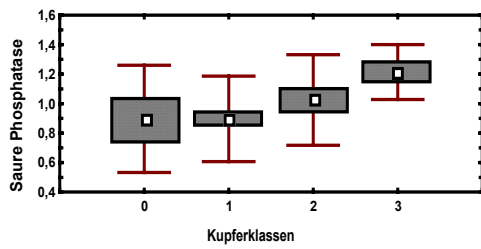
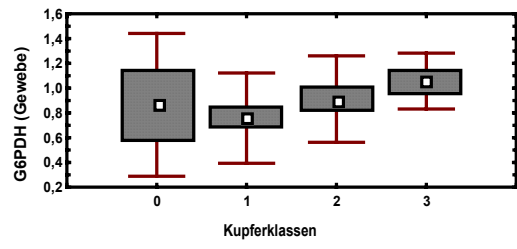
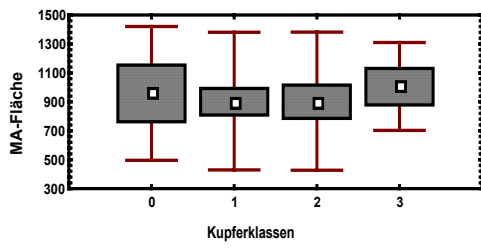
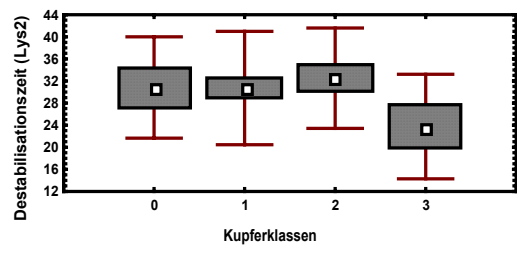
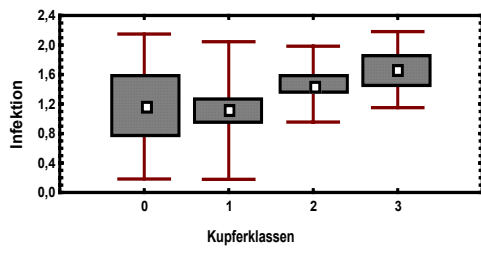


Abb. 4.11.: Reaktion der untersuchten Parameter auf die Belastung der Meeräschen im Mittelmeer mit Kupfer.

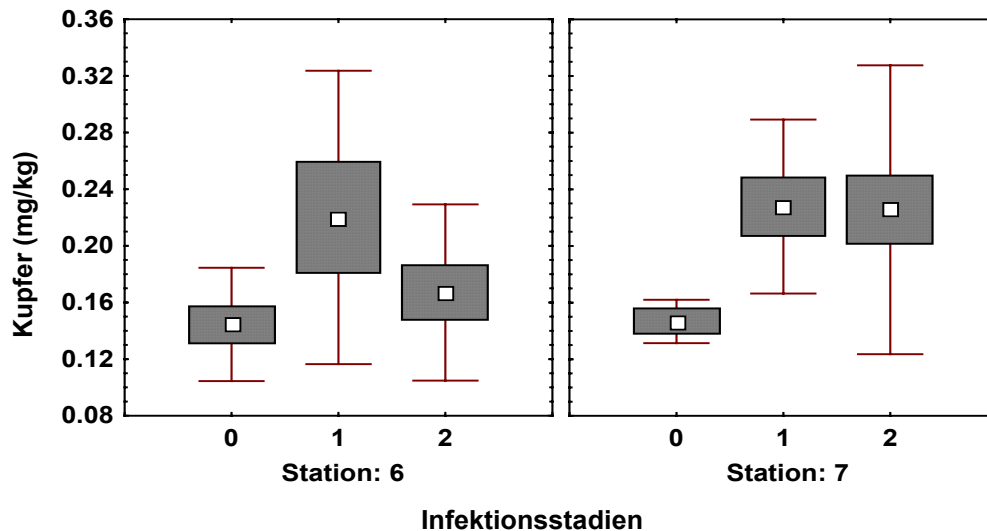


Abb. 4.12.: Kupferkonzentrationen und Infektionen mit *Myxobolus* in der Leber von Meeräschen aus zwei unterschiedlich belasteten Stationen im Mittelmeer.

### Schlussfolgerung

Mehrere Ergebnisse dieser Studie treten besonders hervor. Dadurch, dass zwei unterschiedlich belastete Meere mit jeweils verschieden stark belasteten Stationen untersucht wurden und zudem noch zwei unterschiedliche Fischarten als Indikatoren eingesetzt worden sind, waren in Bezug auf die Antwort des Immunsystems und die Biomarkerantwort uneinheitliche Ergebnisse zu erwarten. Tatsächlich waren die Reaktionen sämtlicher physiologischer und immunologischer Parameter auf die Schadstoffkonzentration in den jeweiligen Arten aber sehr einheitlich. In den Kaninchenfischen aus dem Roten Meer konnte der Beginn der Belastung- von Konzentrationen unter der Nachweisgrenze bis sehr niedrigen Konzentrationen- verfolgt werden, in den Meeräschen aus dem Mittelmeer dann die fortgeschrittenen und chronischen Belastungssituationen.

Deutlich wurde zudem, dass jeder einzelne untersuchte Schadstoff in anderer Weise und Intensität die Biomarkerantwort beeinflusste. Um dies zu demonstrieren, wird hier die vollständige umfangreiche Korrelationstabelle CKWs und Biomarkerantwort abgebildet (Tab. 4.4.).

Für einige Parameter konnten keine Korrelationen mit den Schadstoffrückständen festgestellt werden. Ein Beispiel dafür ist die G6PDH, auf deren Aktivität in den nächsten Kapiteln noch intensiv eingegangen wird. Dies lag an der Tatsache, dass es bei geringerer Schadstoffbelastung zuerst einmal zur Induktion der Enzymaktivität kam, als Zellschutzmechanismus vor oxidativem Stress und als Folge der Induzierung der NADPH-abhängigen Biotransformation (CYP1A1). Dann, bei höherer Belastung war eine Inhibierung der Enzymaktivität zu verfolgen. Die Zusammenhänge zwischen Enzymaktivität und Belastung waren also nicht linear, daher keine Korrelation.

	Gültige N	Kendalls Tau	p-Niveau
HCB & INFEKTION	56	-.279739	.002329
HCB & MA-GRÖßE	57	-.186796	.040144
HCB & MA-SP	57	-.287269	.001599
HCB & LYS1	57	-.020756	.819614
HCB & LYS2	57	-.128363	.158457
HCB & PGDH	50	-.326336	.000826
HCB & PGDHG	50	.074633	.444413
HCB & G6PDH	46	.046777	.646668
HCB & G6PDHG	46	.077003	.450493
HCB & EROD	38	.331549	.003387
HCB & LSI	58	.627403	.000000
HCB & KONDITION	58	-.267687	.002996
HCB & NOS	52	-.040322	.673087
HCB & MA-ANZAHL	32	-.704064	.000000
γ-HCH & INFEKTION	18	.138897	.420849
γ-HCH & MA-GRÖßE	19	.042722	.798271
γ-HCH & MA-SP	19	-.506559	.002441
γ-HCH & LYS1	19	-.165125	.323217
γ-HCH & LYS2	19	-.347045	.037875
γ-HCH & PGDH	16	.017710	.923772
γ-HCH & PGDHG	16	.079358	.668109
γ-HCH & G6PDH	13	-.096664	.645519
γ-HCH & G6PDHG	13	.274385	.191650
γ-HCH & EROD	10	-.116405	.639412
γ-HCH & LSI	19	.347878	.037416
γ-HCH & KONDITION	19	.152578	.361346
γ-HCH & NOS	16	-.202523	.273880
γ-HCH & MA-ANZAHL	12	-.092214	.676429
p,p-DDE & INFEKTION	56	-.209900	.022339
p,p-DDE & MA-GRÖßE	57	-.246627	.006736
p,p-DDE & MA-SP	57	-.023884	.793007
p,p-DDE & LYS1	57	-.055603	.541276
p,p-DDE & LYS2	57	-.127015	.162875
p,p-DDE & PGDH	50	-.315753	.001214
p,p-DDE & PGDHG	50	.036502	.708376
p,p-DDE & G6PDH	46	.117159	.250925
p,p-DDE & G6PDHG	46	.035958	.724563
p,p-DDE & EROD	38	.099929	.377142
p,p-DDE & LSI	58	.368374	.000044
p,p-DDE & KONDITION	58	-.078182	.385995
p,p-DDE & NOS	52	-.209563	.028323
p,p-DDE & MA-ANZAHL	32	-.315486	.011163
OCS & INFEKTION	56	-.088131	.337451
OCS & MA-GRÖßE	57	-.247510	.006542
OCS & MA-SP	57	-.213537	.018974
OCS & LYS1	57	-.085616	.346894
OCS & LYS2	57	-.104652	.250238
OCS & PGDH	50	-.285702	.003416
OCS & PGDHG	50	.039961	.682188
OCS & G6PDH	46	.048766	.632730
OCS & G6PDHG	46	.168468	.098758
OCS & EROD	38	.193880	.086617
OCS & LSI	58	.301656	.000823
OCS & KONDITION	58	-.187401	.037713
OCS & NOS	52	-.281689	.003204
OCS & MA-ANZAHL	32	-.305513	.013997

Dieldrin & INFEKTION	56	-.140405	.126471
Dieldrin & MA-GRÖßE	57	-.175378	.054003
Dieldrin & MA-SP	57	-.077736	.393074
Dieldrin & LYS1	57	-.190306	.036545
Dieldrin & LYS2	57	-.143817	.114093

Dieldrin & PGDH	50	-.296527	.002378
Dieldrin & PGDHG	50	-.020866	.830690
Dieldrin & G6PDH	46	-.099163	.331173
Dieldrin & G6PDHG	46	.051682	.612535
Dieldrin & EROD	38	.359449	.001489
Dieldrin & LSI	58	.210153	.019794
Dieldrin & KOND.	58	-.310975	.000564
Dieldrin & NOS	52	-.090058	.346024
Dieldrin & MA-ANZAHL	32	-.250873	.043606
PCB28 & INFEKTION	22	-.031923	.835275
PCB28 & MA-GRÖßE	24	-.223872	.125367
PCB28 & MA-SP	24	-.319292	.028824
PCB28 & LYS1	24	-.286707	.049669
PCB28 & LYS2	24	-.397462	.006508
PCB28 & PGDH	19	-.209585	.209898
PCB28 & PGDHG	19	-.101190	.544930
PCB28 & G6PDH	16	.093618	.613005
PCB28 & G6PDHG	16	.092828	.616004
PCB28 & EROD	12	-.153864	.486205
PCB28 & LSI	24	.473434	.001191
PCB28 & KONDITION	24	.077071	.597759
PCB28 & NOS	19	-.099973	.549777
PCB28 & MA-ANZAHL	16	-.221729	.230943
PCB153 & INFEKTION	56	-.163187	.075712
PCB153 & MA-GRÖßE	57	-.191163	.035708
PCB153 & MA-SP	57	-.094162	.300892
PCB153 & LYS1	57	-.255992	.004916
PCB153 & LYS2	57	-.255061	.005075
PCB153 & PGDH	50	-.352419	.000305
PCB153 & PGDHG	50	-.111859	.251708
PCB153 & G6PDH	46	.023806	.815539
PCB153 & G6PDHG	46	.072816	.475495
PCB153 & EROD	38	.298146	.008413
PCB153 & LSI	58	.360666	.000064
PCB153 & KOND.	58	-.225787	.012294
PCB153 & NOS	52	-.137088	.151450
PCB153 & MA-ANZAHL	32	-.348695	.005037
CU & INFEKTION	56	.157928	.085635
CU & MA-GRÖßE	57	-.017228	.849878
CU & MA-SP	57	.195554	.031676
CU & LYS1	57	.037919	.676968
CU & LYS2	57	-.131204	.149447
CU & PGDH	50	-.035237	.718046
CU & PGDHG	50	.122416	.209701
CU & G6PDH	46	.290199	.004458
CU & G6PDHG	46	.224664	.027693
CU & EROD	38	-.130931	.247202
CU & LSI	58	-.109589	.224307
CU & KONDITION	58	.315934	.000460
CU & NOS	52	-.351192	.000238
CU & MA-ANZAHL	32	.119024	.338389

Tab. 4.4.: Korrelationen zwischen CKW-Konzentrationen im Lebergewebe von Meeräschen der Israelischen Mittelmeerküste und Biomarkerantwort.



Nach diesen Korrelationen wurde eine Hierarchie der Effekte und der Schadstoffwirkungen erstellt:

1. Signifikante Reaktionen auf verschiedene Schadstoffe (Anzahl/Gesamtzahl)

(1) LSI	7/8
(2) PGDH	5/8
(3) MA-SP	5/8
(4) MA-Anzahl	5/8
(5) Kondition	5/8
(6) MA-Größe	4/8
(7) Lys	4/8
(8) NOS	3/8
(9) EROD	2/8

2. Wirksamkeit der Schadstoffe in Anzahl verursachter signifikanter Effekte

(1) HCB	8
(2) OCS	7
(3) PCB 153	7
(4) Dieldrin	6
(5) Cu	5
(6) p,p-DDE	5
(7) PCB 28	4
(8) $\chi$ -HCH	3

Ein weiteres Ergebnis war die signifikant negative Korrelation zwischen Rückständen von PCB und Rückständen von Kupfer im Muskelgewebe und die Tatsache, dass hohe Konzentrationen von Kupfer in dieser Species mit einer Erhöhung der Sauren Phosphataseaktivität einhergingen, hohe CKW Konzentrationen die MA-SP Aktivität aber hemmten.

## Kapitel 5

### Einfluß von Parasiteninfektionen der Leber auf die untersuchten MA-Parameter und - Biomarker in *Liza aurata* von zwei unterschiedlich belasteten Stationen der Israelischen Mittelmeerküste

#### Einleitung

##### Einzellige Fischparasiten

Parasiten besiedeln ihren Wirt und beziehen ihre Lebensgrundlagen zumindest zum Teil, wenn nicht ganz und gar von ihrem „Gastgeber“. Daher ist es für sie von ganz grundlegendem Interesse, dass der Wirt am Leben bleibt. So leben die meisten Parasiten in einem mehr oder weniger ausgewogenen Verhältnis mit ihrem Wirt. Sie sind wesentlich kleiner als er und vermehren sich schneller. Die Pathogenität der Schmarotzer reicht von extrem pathogenen Arten, wie zum Beispiel *Tetrahymena* in Fischen, bis hin zu Arten, die ihren Wirt kaum behindern, wie manche Myxosporea. Verbindungen, die eine Symbiose darstellen, bei der sowohl der Wirt, als auch der Parasit profitieren, sind bei Fischen nicht bekannt (Lom und Dykova 1992).

Endoparasiten, wie die Myxosporidien leben coelozoisch, wenn sie Körperhöhlungen ihres Wirtes, wie die Bauchhöhle, die Blase, oder die Gallenblase besiedeln und histocoelisch, wenn sie in Organen des Wirtes, im Gewebe leben. Hier können sie entweder intrazellulär oder, wie im Fall der meisten Myxosporidien extrazellulär vorkommen (Kudo 1919).

*Myxobolus muelleri* ist in der Lage, verschiedene Organe des Wirtes zu besiedeln. Das Ausmaß der pathologischen Veränderungen in Geweben und Organen ist nicht nur durch die Art des Parasiten und die Befallsintensität bestimmt, sondern zu einem großen Teil auch abhängig von der Reaktion des Wirtes. Besonders in Fischen stellt dies ein hoch variables Element in der Histopathologie dar (Lom and Dykova, 1992). Die Entwicklung pathologischer Veränderungen im Verlauf einer Infektion (Pathogenese) und das variable Bild histopathologischer Erscheinungen werden nicht zuletzt auch durch den Temperatureffekt auf beide, Wirt und Parasit, bestimmt. Das ist einer der Gründe, warum durch Protozoen hervorgerufene histopathologische Erscheinungen in Fischen nicht so klar definiert werden können, wie in höheren Vertebraten.

Wie jedes andere Pathogen muß sich auch ein parasitischer Einzeller mit der Immunantwort oder der Resistenz des Wirtes auseinandersetzen, wenn er ihn erfolgreich besiedeln will. Fische besitzen wie alle Vertebraten sowohl eine unspezifische Immunantwort gegen Pathogene, denen sie das erste Mal entgegen treten müssen als auch eine spezifische Immunantwort gegen Eindringlinge, gegen die während längerer oder wiederholter Einwirkung bereits Antikörper gebildet worden sind (Ellis, 1978).

Die natürliche oder nicht spezifische Immunität in Fischen wird bestimmt durch lösliche Komponenten und durch phagozytierende und/oder cytotoxische Zellen der zellulären Immunität. Die löslichen Faktoren wirken zum Beispiel im Blut oder im Schleim auf der Körperoberfläche und werden von aktivierten Zellen sezerniert. Sie umfassen unter anderem Komplement, Lysozym, Transferrin, C-reaktives Protein, Interferon, Agglutinin und Lysin. Der Schleim auf der Körperoberfläche kann außerdem Immunglobuline enthalten (Iwama und Hakanishi, 1996).

Die Phagozytose wird hauptsächlich von einkernigen Phagozyten durchgeführt, als da wären: Monozyten, Retikoendothelialzellen, die den Blutgefäßen anliegen, sowie Makrophagen. Bei einigen Fischarten sind außerdem Granulozyten in diesen Prozess eingebunden. In frühen Entwicklungsstadien, bevor die Immunkompetenz ausgebildet ist, ist das retikuloendotheliale System vermutlich die einzige Möglichkeit der Abwehr (Agius, 1980).

Phagozytose stellt neben der direkten Abwehr von Infektionen durch Präsentation von Antigenen auch den initialen Schritt der spezifischen Immunantwort dar und liegt damit im Zentrum der Verteidigung gegen Krankheitserreger (Klein 1991).

Eine perfekt funktionierende natürliche (innate) Immunität schützt den Fisch vor eindringenden Keimen und verringert die Möglichkeit einer Besiedelung durch Parasiten (Woo 1987).

Erworbene oder spezifische Immunität gegenüber Pathogenen (Antigene), braucht Zeit für die Entwicklung, bei einer nochmaligen Begegnung mit den Erregern reagiert sie aber schneller und gezielter als während der Primärantwort. Fische produzieren Antikörper, Immunoglobuline, die an Antigene spezifisch und in einer den gleichwarmen Vertebraten grundlegend identischen Weise binden (Iwama und Hakanishi 1996). Aufgrund der Poikilothermie der Fische hat jedoch die Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Kinetik der Antikörperproduktion. Verschiedene Fischarten haben unterschiedliche Temperaturoptima für die primäre und sekundäre Immunantwort. In nicht optimalen Temperaturen kommt es zu einer Verzögerung der Antikörperproduktion.

Ein herausragender Teil der spezifischen Immunantwort ist die durch Antikörper und Komplement vermittelte Phagozytose. Aber auch nicht-lymphoide Abwehr, bei der Makrophagen mobilisiert werden, ohne dass Antikörper eine Rolle spielen, ist ein wichtiger Faktor. Einige Autoren vermuten, dass der zellulären Immunität eine wichtigere Rolle beim Überleben der Wirte zufällt, als der humoralen Immunität. Wie von Iwama und Hakanishi (1996) beschrieben, eliminieren monozytären Makrophagen verschiedenste Antigene, wie zum Beispiel Sporen von Protozoen. Sie transportieren diese in die Leber, die Niere und die Milz, wo sie in großen Gruppen aggregieren. Nach der Einkapselung mit Bindegewebe kann es zu einer vollständigen Zerstörung und Verdauung der Parasiten innerhalb dieser Aggregate kommen (Dykova 1984).

## Myxosporidien

### *Entwicklungszyklus*

Sporen von Myxosporidien sind zwischen 10 und 20 µm groß, vegetative Entwicklungsstadien, oder Trophozoiten sind sehr variabel in Größe und Form. Manche Plasmodien sind aufgrund ihrer Größe, die von einigen mm bis zu 2cm (*Sphaeromyxa maiyai*) betragen kann bereits makroskopisch zu erkennen. Diese Plasmodien beinhalten viele Kerne und spezialisierte Zellen, aus denen Massen von Sporen hervorgehen. Histozytische Plasmodien sind von Bindegewebe umgeben und erscheinen als eine Art Zyste im Gewebe. Auf der anderen Seite der Größenklasse gibt es Plasmodien, die nur 10 µm groß sind und nur eine einzige Spore hervorbringen (*Spaerospora molnari*). Kleine Plasmodien erscheinen im Gewebe als eine Art diffuse Infiltration. Trophozoiten machen einen rein proliferativen Zyklus durch, der in der Regel mit Sporogonie gekoppelt ist. Interzelluläre oder histozytische Trophozyten sind nicht mobil, abgerundet und fest eingebunden in das Wirtsgewebe (Lom und Dykova, 1992).

### *Sporen*

Sporen bestehen aus Schalenhälften, die miteinander verbunden sind und enthalten Polkapseln und Sporoplasma. Das Sporoplasma ist eine lebensfähige Zelle, die den infektiösen Keim darstellt. Je nach Genus gibt es zwischen 2 und 7 Schalentteile, eine bis 7 Polkapseln und ein- oder zweikerniges oder zwei einkernige Sporoplasmen in einer Spore. In einigen zweikernigen Sporoplasmen, so bei *Myxobolus* und *Henneguya*, kommen Polysaccharidreserven in Form von β-Glycogen, eingeschlossen in einer runden Vakuole, die „Glycogenvakuole“ genannt wird, vor. Diese Vakuole kann ein paar Tage nach der Freisetzung der Sporen durch den Wirt

verschwinden. Die Schalen sind widerstandsfähig und aus einem nichtkeratinösem Protein aufgebaut und dienen der weiten Verbreitung und sicheren Aufnahme durch einen weiteren Wirt (Lom und Dykova, 1992).

Die Infektion der Leber mit einzelligen Parasiten (Myxosporidien) in Meeräschen von zwei unterschiedlich stark belasteten Stationen im Mittelmeer diente im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Modell für die Untersuchung, ob und in wieweit eine Leberinfektion mit Protozoen Einfluss auf die Antwort von Biomarkern, insbesondere von Immunreaktionen, auf Schadstoffeinfluss nehmen würde.

## *Ergebnisse*

### Diagnostik und Histopathologie

Mit Hilfe diagnostischer Untersuchungen an Gefrierschnitten (10µm) und in Methacrylat eingebetteten Leberschnitten (2 µm) (Enzymhistochemische Färbungen, H&E, PAS und Ziehl-Neelsen Färbungen, s. Einleitung) wurde eine Einordnung der Meeräschen in drei Infektionsklassen vorgenommen, die folgendermaßen charakterisiert werden können:

- Klasse 0 Keine Infektionsanzeichen im Lebergewebe, keine Infiltrationen und Plasmodien in der Leber.
- Klasse 1 Diffuse Infiltrationen im Leberparenchym, basophile, PAS positive Einschlüsse in Hepatozyten und interzellulär, keine Plasmodien, keine Sporen (Abb. 5.1). Dieses Stadium war häufig mit der Proliferation von Gallengängen verbunden.
- Klasse 2 Plasmodien und Sporen im Lebergewebe (Abb. 5.2). Anhand der Morphologie der Plasmodien und Sporen wurde die Gattung der einzelligen Parasiten als *Myxobolus sp.* identifiziert.

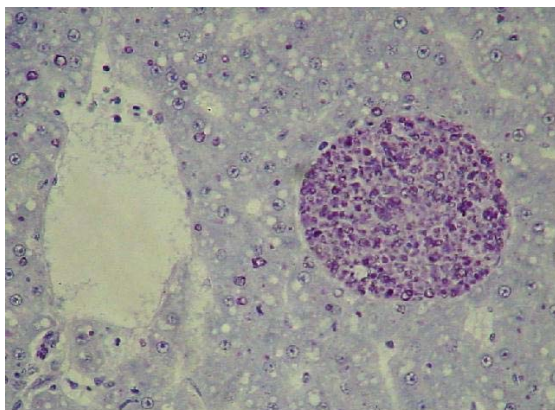


Abb. 5.1: Infektionsklasse 1: Diffuse Infiltrationen im Leberparenchym von *Liza aurata*, PAS, x 400.

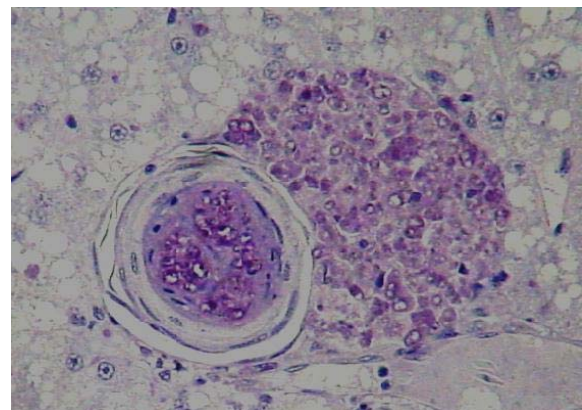


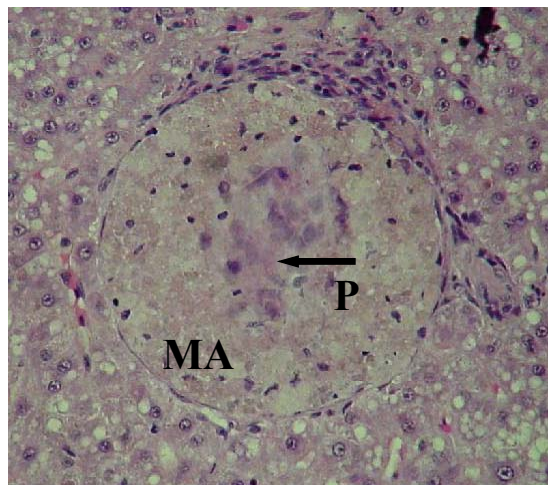
Abb. 5.2: Infektionsklasse 2 : Plasmodien und Sporen von *Myxobolus sp.* im Lebergewebe von *Liza aurata* sichtbar, PAS, x 420.

### Bildung von Plasmodien und Reaktion des Immunsystems

Die Bildung der histozoiden Plasmodien konnte anhand der lichtmikroskopischen Schnitte der infizierten Meeräschenlebern verfolgt werden (Abb. 5.3, 5.4, 5.5).

Im Verlauf der Abkapselung der Parasiten wurden zunächst Makrophagen und neutrophile Granulozyten an den Befallsstellen gefunden. Andere mesenchymale Zellen entwickelten sich zu spindelförmigen Histiocytin und Fibroblasten, welche die Abkapselung einleiteten. Diese Kapselbildung wurde am Rand von Gallengängen, an größeren Blutgefäßen, aber auch aus dem Zentrum von Makrophagenagregaten heraus beobachtet. Letzteres zeigt, dass die Makrophagen Aggregate keine absolut abgeschlossenen Gebilde sind, sondern die Einwanderung anderer Zellen, wie neutrophiler Granulozyten nach Bildung der Aggregate noch möglich ist.

**A**



**B**

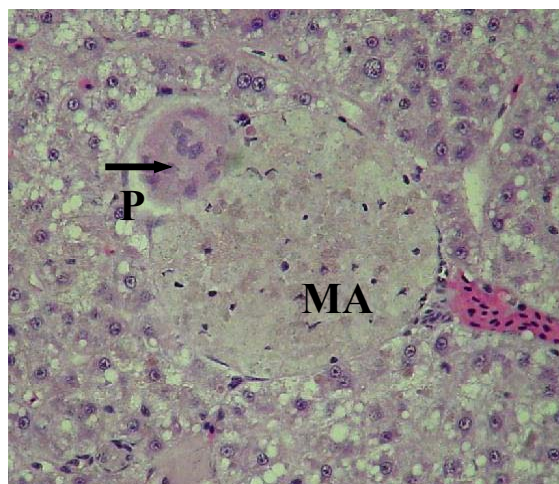


Abb. 5.3: Bildung von Plasmodien (A) im Zentrum eines Makrophagen Aggregates (MA), (B) am Rand eines Makrophagen Aggregates, H&E-Färbung, x 400.

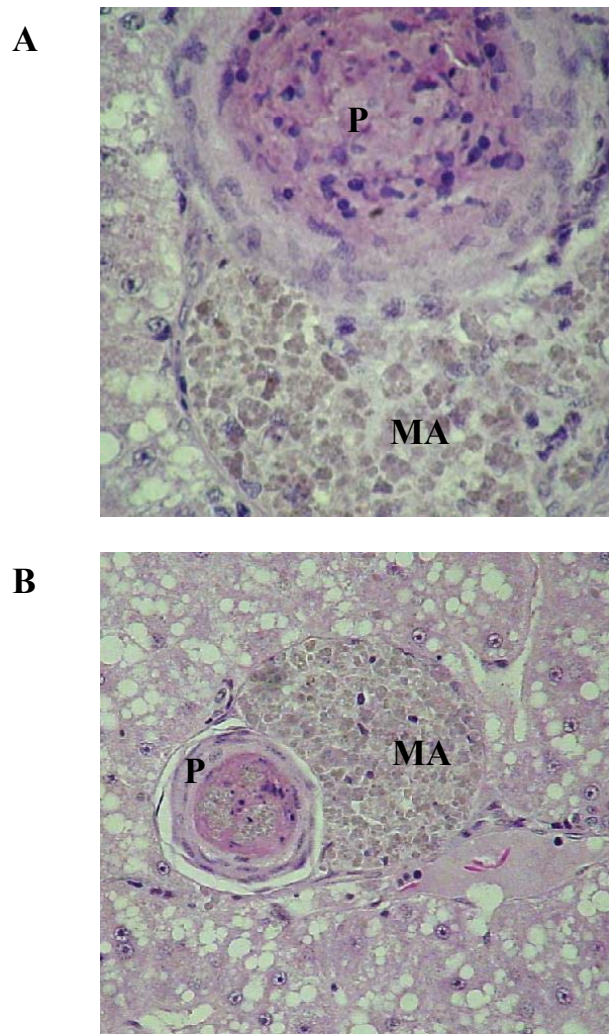


Abb. 5.4: Fortgeschrittenene Plasmodienstadien. P= Plasmodium, MA= Makrophagen Aggregat. H&E, (A) x 500, (B) x 400.

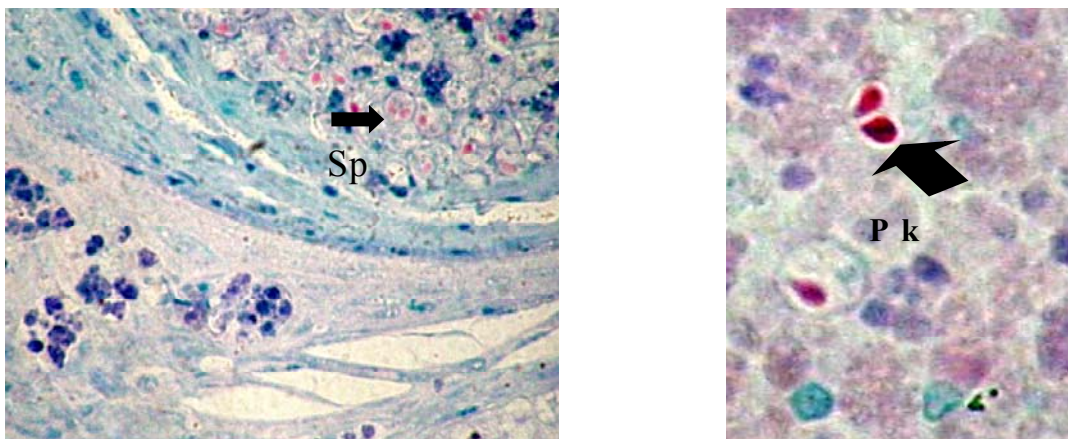


Abb. 5.5: Ausschnitt aus einem Plasmodium mit reifen Sporen (Sp), Detail mit angefärbten Polkapseln (Pk). Ziehl-Neelsen, x 400, x 600.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Kapselbildung vielfach nicht nur Abwehr/Isolierung seitens des Wirtes, sondern zugleich auch Schutz für den Parasiten bedeutet. Offensichtlich werden die Außenschichten der Kapsel als wirtseigen erkannt, so dass weitere Reaktionen gegen den Parasiten unterbleiben (Bryant und Behm 1989).

In dem vorliegenden Fall konnte allerdings eine Anlagerung von Makrophagen, sowie eine Aggregatbildung am Rande der Plasmodien verfolgt werden. Diese Makrophagen Aggregate gingen auf vielerlei Art gegen die sich bildenden und bereits gebildeten Plasmodien vor.

So wurde eine Freisetzung von saurer Phosphatase durch die Makrophagen in die Plasmodien, insbesondere in die äußerste, bindegewebige Schicht der Zysten beobachtet (Abb. 5.6). Freisetzung von Saurer Phosphatase durch die Makrophagen Aggregate wurde auch unabhängig vom Vorhandensein von Plasmodien in Meeräschen und Kaninchenfischen beobachtet. Insbesondere Aggregate mit einer hohen Aktivität der Saurer Phosphatase entließen dieses Enzym in das umliegende Lebergewebe. Diese Freisetzung führte zu einer Abnahme der Lysosomenmembranstabilität in den betroffenen Leberzellen bis hin zu dem niedrigsten, noch messbaren Destabilisationswert von 2 Minuten.

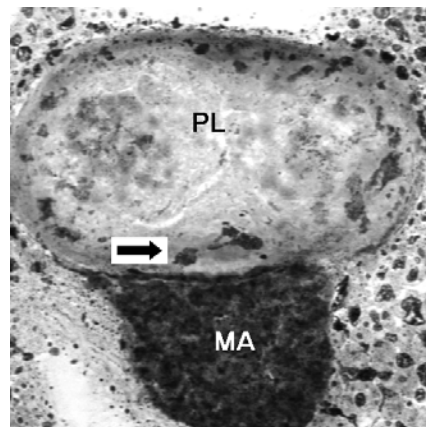


Abb. 5.6.: Freisetzung von Saurer Phosphatase aus einem Makrophagenaggregat (MA) in ein *Myxobolus*-Plasmodium (PL), Cryoschnitt, x 400.

Eine weitere Antwort der Makrophagen auf die Plasmodienbildung war die Induktion der iNOS in einzelnen Makrophagen der Aggregate, in Einzelmakrophagen im Lebergewebe, aber in besonders ausgeprägtem Maße in der äußeren Schicht der bindegewebigen Hülle der Plasmodien. Diese iNOS- Aktivität in der Hülle war hemmbar zu 45% durch den spezifischen Inhibitor Methylarginin und zu 80% durch den Inhibitor Diphenyleniodonium (Abb. 5.7.1). Die selbe Hemmbarkeit zeigte sich in den Einzelmakrophagen im Lebergewebe infizierter Meeräschen (Abb. 5.7.2), sowie in den Gallengangsepithelien (Abb. 5.7.3).

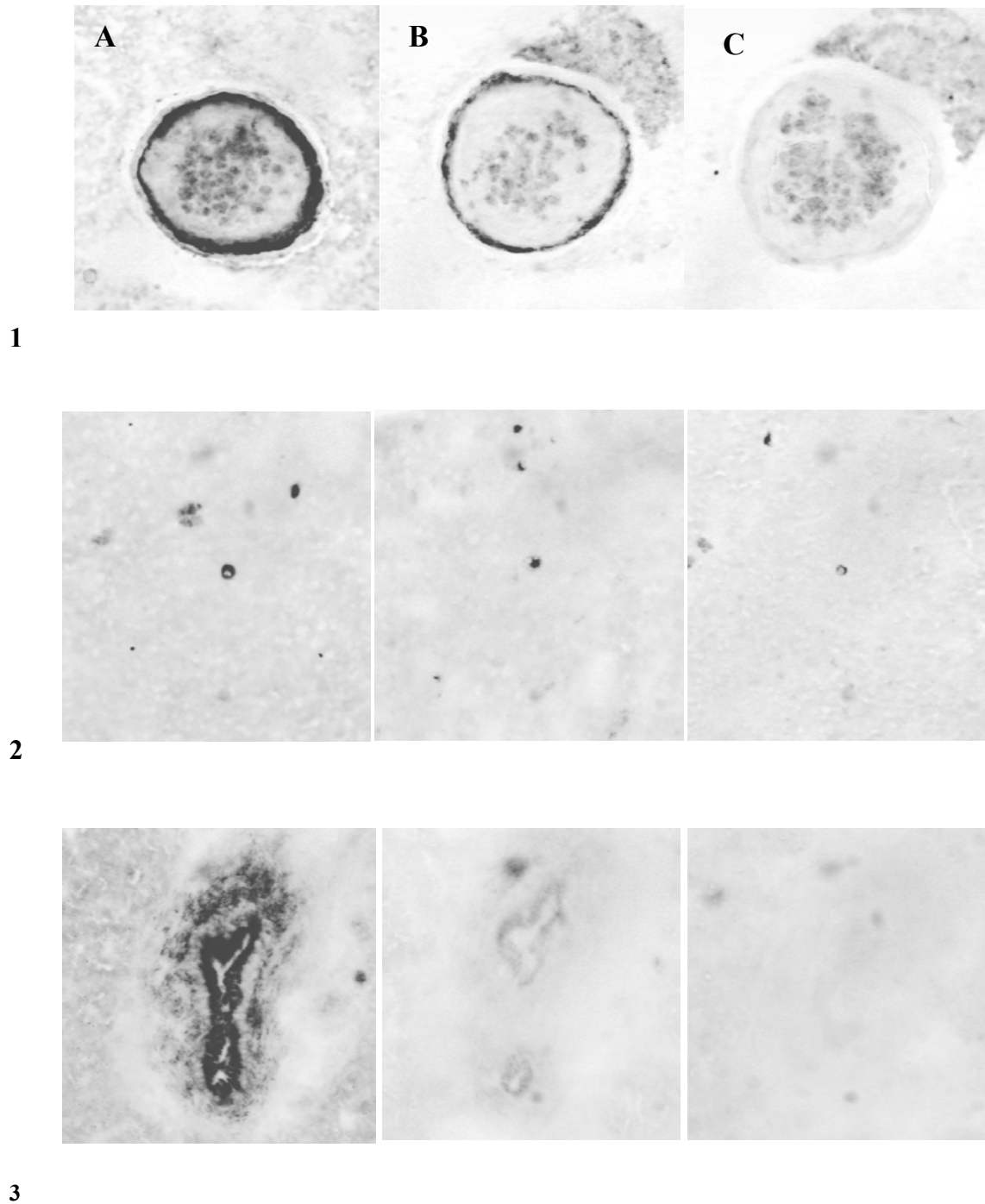


Abb. 5.7: NOS-Aktivität und der Einfluß verschiedener Inhibitoren: (A) ohne Inhibitor, (B) mit  $N^G$ -methyl-L-arginine (L-NMMA), (C) mit Diphenyliodonium. (1) in Plasmodienrand, (2) in Einzelmakrophagen, (3) in Gallengangsepithelien, Cryoschnitt, x 400.

Ähnlich wie bei der NOS, so konnte auch bei der G6PDH eine besonders hohe Aktivität in der Plasmodienhülle, in einzelnen Makrophagen in den Aggregaten und in Einzelmakrophagen im Lebergewebe gemessen werden (Abb. 5.8). Eine einheitliche Aktivität im ganzen Aggregat, wie bei der Sauren Phosphatase, wurde für beide Enzyme nicht festgestellt.



Innerhalb der Plasmodien, in denen Sporogenese stattfand wurde keine G6PDH-Aktivität festgestellt, allerdings eine extrem hohe PGDH-Aktivität. Auch in den Makrophagen Aggregaten infizierter Fische war die G6PDH-Aktivität sehr niedrig, PGDH aber hoch. In nicht infizierten Fischen hingegen, wurde eine höhere G6PDH-Aktivität in Makrophagen gemessen. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Parasiten den Stoffwechsel der Makrophagen verändern, um die Immunkompetenz zu verringern und sich als Folge davon im Wirtsorganismus ausbreiten zu können. Ziel der Veränderung scheint in diesem Fall die G6PDH zu sein, die sich daher als ein Schlüsselenzym für eine funktionierende nicht-spezifische Immunabwehr erweist.

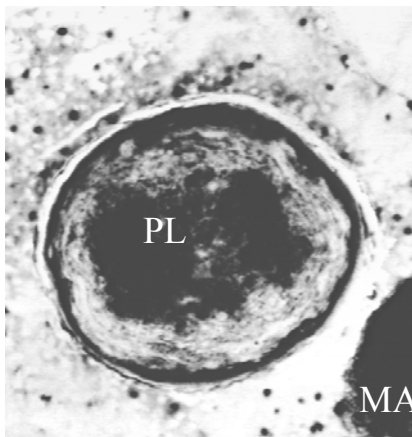
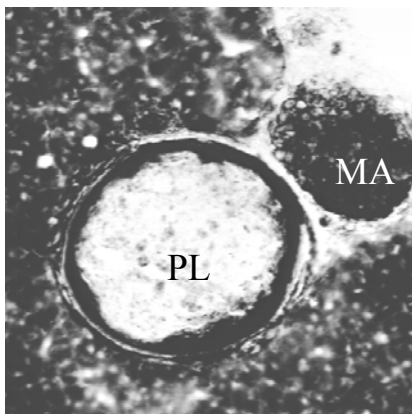


Abb. 5.8: Oben: G6PDH, unten PGDH-Aktivität in Plasmodium (PL) und Makrophagenaggregat (MA), Cryoschnitte, x 400.

## Histopathologie des Lebergewebes von *Liza aurata* unterteilt nach Belastungsgruppen (PCB153) und Infektionsklassen

### *Belastungsgruppe 3, Nicht infiziert*

Die hohe Belastung mit chlororganischen Schadstoffen führte zur Entwicklung großer nekrotischer Bereiche in der Leber, insbesondere um die Gefäße herum. Dieses Phänomen ging mit einer Vakuolisierung der Hepatozyten, zum Teil auch der Makrophagen in den Aggregaten einher. Reservestoffe (Glycogeneinlagerungen) waren nur sehr vereinzelt zu beobachten. In einigen hochbelasteten Mugiliden fand sich Glycogen vermehrt in den Hepatozyten, die den großen Gefäßen anliegen. Auffällig waren wirbelartige Strukturen im Lebergewebe. In Fischen mit diesen extremen histopathologischen Gewebsveränderungen war die Aktivität von EROD, G6PDH und PGDH sowie die Stabilität lysosomaler Membranen herabgesetzt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Flunder in der Nordsee kam es in den Meeräschen zu keiner Aufhellung der Leber, verursacht durch vermehrte Einlagerung von Neutrallipiden durch Schadstoffeinfluss. Lebern von Meeräschen aus der höchsten Belastungsstufe waren dunkelbraun.

Makrophagen Aggregate waren in den hochbelasteten Fischen sehr groß, zum Teil nicht mehr klar abgegrenzt, sondern wirkten „ausgefranst“, beziehungsweise in Auflösung begriffen. Sie beinhalteten eosinophile Granula und erschienen extrem kondensiert. Die Anzahl der Aggregate war im Vergleich zu den nicht belasteten Mugiliden geringer ( $4 \pm 1$ ). Dies war ein besonders ins Auge fallendes Phänomen, was bei allen mittelmäßig- und hochbelasteten Meeräschen zu beobachten war.

In diesen hochbelasteten Fischen war häufig keine Myxosporidieninfektion festzustellen.

### *Belastungsgruppe 3, Infektionsklasse 2*

In einem Tier ging eine sehr hohe chemische Belastung, insbesondere mit DDE und PCBs mit einer Infektion mit Plasmodienbildung einher. In der Leber dieses Individuums wurden als einzigem Fall Sporen frei im Lebergewebe und intakt in Makrophagen Aggregaten vorgefunden. In allen anderen Fällen waren die Sporen in den Plasmodien eingeschlossen. Fand man Sporen in MA, so befanden sich diese in unterschiedlichen Abbaustadien. Plasmodienbildung, sowie Aggregatformation erschienen in diesen hochbelasteten Fischen unvollkommen. Wie oben beschrieben, in den Fischen mit hoher Belastung und ohne Infektion wirkten die MA in Auflösung begriffen. Außerdem waren trotz der Infektion nur sehr wenig Makrophagen Aggregate in der Leber zu beobachten. Im Lebergewebe waren große nekrotische Bereiche zu erkennen, die verbreitet als "dark cell areas" erschienen und nicht nur auf die Gefäßnähe beschränkt waren. Außerdem kamen verbreitet "apoptotic bodies" in Hepatozyten vor.

Die Gallengänge waren proliferiert. Neben einer niedrigen Lysosomenmembranstabilität wurde trotz hoher chemischer Belastung auch eine sehr geringe EROD-Aktivität gemessen. Die NOS Aktivität war extrem niedrig in Gallengängen und MA.

### *Belastungsgruppe 2, Infektionsklasse 1 (diffuse Infiltrationen)*

Einzelzellnekrosen, vakuolisierte Einzelzellen um die Gefäße herum, Pyknosen und Mehrkernigkeit waren charakteristisch für die histopathologischen Veränderungen in dieser Belastungsstufe. Die betroffenen Bereiche waren allerdings deutlich kleiner, als bei höherer Belastung (Stufe 3). Diese Belastungsstufe war häufig verbunden mit der Infektionsklasse 1, das bedeutet mit diffusen Infiltrationen und basophilen Einschlüssen in den Hepatozyten und in den Interzellularen.

Die Makrophagen waren mittelgroß und zum Teil vakuolisiert aber nicht so stark kondensiert, wie in den Meeräschen aus der höchsten Belastungsstufe. Glycogen fand sich in größeren Bereichen und nicht, wie in Belastungsgruppe 3 in kleinen Granula in den Hepatozyten. Die Menge der Reservestoffe war aber auch in dieser Gruppe eher gering. In den Hepatozyten waren regelmäßig eosinophile Granula zu erkennen.

Interessant war eine große Variabilität in der EROD Aktivität. In einigen Fällen war EROD nur gering induziert, in anderen war eine hohe Induktion zu verzeichnen.

### *Belastungsgruppe 1*

Die am geringsten belasteten Meeräschen zeigten hohe Enzymaktivitäten von Saurer Phosphatase und PGDH in MA bei mittlerer Größe der Makrophagen Aggregate. Die Biomarkerantwort war, als Folge der hohen Immunaktivität deutlich. So wurde eine niedrige Lysosomenmembranstabilität gemessen. EROD war nicht induziert. Da in dieser Belastungsstufe häufig Plasmodienstadien und Infiltrationen zu beobachten waren, zeigten sich auch im Lebergewebe pathologische Veränderungen. Gallengänge waren von viel Bindegewebe umgeben. In den Hepatozyten wurden Reserven, sowohl in Form von Fett, als auch von Glycogen gespeichert. Verbreitet wurden "apoptotic bodies" in den Hepatozyten beobachtet.

War die geringe Belastung mit einer Infektion verbunden, waren die Makrophagen Aggregate von ganz klein bis groß und extrem häufig im Lebergewebe anzutreffen. In Leberbereichen mit hoher Immunaktivität wurden außerdem größere nekrotische Areale beobachtet.

### Besiedelung der Galle mit Myxosporidien und Infektionsklassen in der Leber. Vergleich mit Ergebnissen anderer Kollegen am gleichen Fischindividuum

Die Diagnostik, sowie die Zusammenhänge zwischen der Leberinfektion und den Befunden der parasitologischen Untersuchung der Arbeitsgruppe von Prof. Ilan Paperna an der Gallenflüssigkeit zeigten, dass es sich im vorliegenden Fall um eine *Myxobolus* Infektion handelte. Deutlich wurde, dass bei nicht vorhandenem Befall der Gallenflüssigkeit mit *Myxobolus* (ermittelt durch parasitologische Untersuchungen) auch keine Infektion in der Leber festgestellt werden konnte. Hohe Befallsraten der Gallenflüssigkeit zeigten in der Leber hauptsächlich die Infektionsklasse 1, in der diffuse Infiltrationen und basophile Zelleinschlüsse auftraten, aber keine Zysten zu erkennen waren. In Fischen mit Plasmodien (Infektionsklasse 2) fanden sich in der Gallenflüssigkeit nicht so hohe Befallsraten, wie in den Mugiliden der Infektionsklasse 1 (Abb. 5.9).

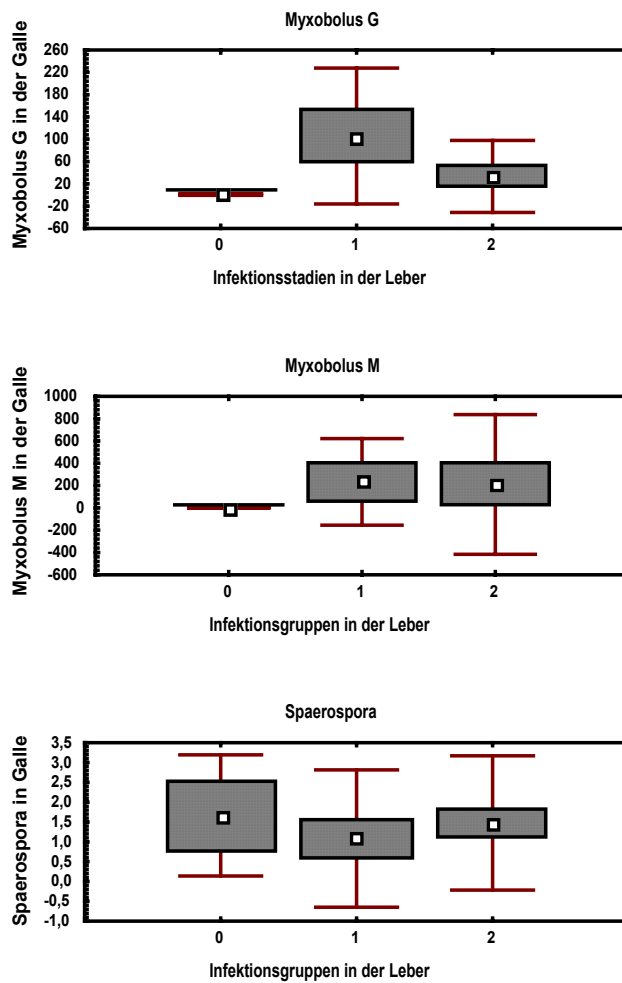


Abb. 5.9: Myxosporidien Befall der Gallenflüssigkeit in unterschiedlichen Infektionsklassen der Leber, Station 7 und Station 6. *Myxobolus* M und G sind zwei verschiedene, nicht näher beschriebene *Myxobolus*-Arten. (Daten von Prof. Ilan Paperna, Rehovot, Israel).

Die Besiedelung der Galle von Mugiliden mit *Myxobolus* war auf der belasteten und der unbelasteten Station nahezu gleich verbreitet (Abb. 5.10). Etwas höhere Befallsraten wurden in den Fischen der belasteten Station gemessen. Dennoch war die Prävalenz der Leberinfektionen mit diesen Einzellern auf der unbelasteten Station höher (Abb. 5.11).

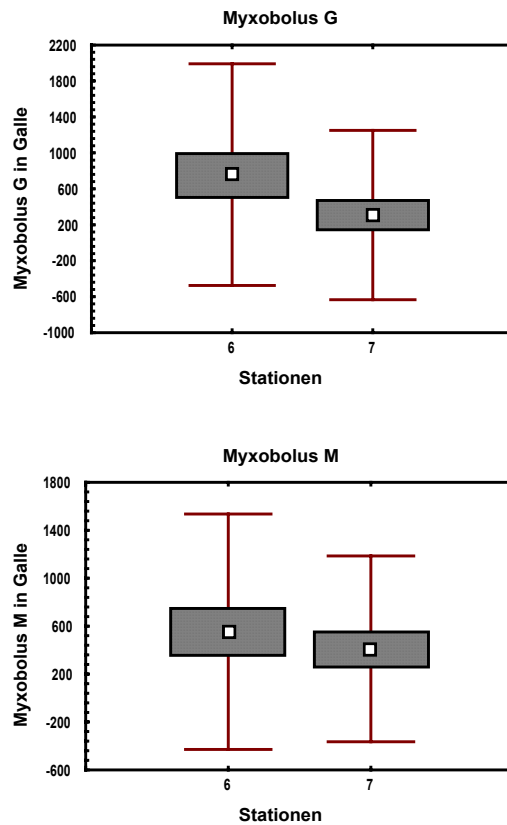


Abb. 5.10: Myxobolus-Befallsraten in der Galle von Meeräschen auf der belasteten (6) und der unbelasteten Station (7). *Myxobolus* M und G sind zwei verschiedene, nicht näher beschriebene *Myxobolus*-Arten. (Daten von Prof. Ilan Paperna, Rehovot, Israel).

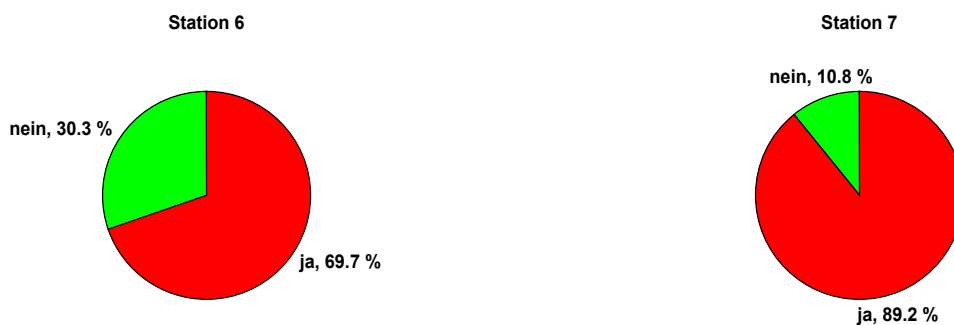


Abb. 5.11: Prozentualer Anteil von Meeräschen mit (ja) und ohne (nein) Leberinfektion auf den beiden untersuchten Stationen. Station 6: belastet, Station 7: unbelastet.

### Geschlechtsabhängige Unterschiede in der Parasiteninfektion und MA-SP Aktivität

Der Anteil der männlichen Fische in der Gruppe der nicht infizierten Meeräschen war niedriger, als der allgemeine Anteil der Männchen an der Gesamtprobe (nicht infiziert 64%, allgemein 68%). Bei den weiblichen Fischen lag der Anteil in der nicht infizierten Gruppe hingegen deutlich höher, nämlich annähernd doppelt so hoch, als ihr Anteil an der Gesamtprobe (nicht infiziert 28,6%, allgemein 19,4%). Dies könnte auf eine höhere Abwehrkraft in weiblichen, verglichen mit den männlichen Mugiliden hindeuten, könnte aber auch eine Folge von unterschiedlichem Verhalten oder Ernährungsgewohnheiten sein. Erstaunlich war, dass die juvenilen Fische, die ebenfalls eine signifikant höhere Makrophagenaktivität (MA-SP, Abb. 5.12) hatten, als die männlichen Fische, einen deutlich geringeren Anteil an den nicht infizierten Individuen ausmachten. Während der allgemeine Anteil juveniler Meeräschen am Gesamtpool bei 21,5% lag, lag der Anteil in der nicht infizierten Gruppe nur noch bei 7,4%, also bei etwas mehr als einem Drittel, verglichen mit dem Ausgangsanteil. Dafür fanden sich in der Infektionsklasse 1 29,2% juvenile Fische, mehr als ihr Anteil am Gesamtpool.

In der Infektionsklasse 2 in der es zu einer Fortpflanzung der Einzeller innerhalb der Plasmodien kam, war der Anteil der juvenilen Meeräschen wieder geringer als in der Gesamtprobe (20%). Juvenile Fische werden vermutlich zunächst infiziert, daher der geringe Anteil juveniler Meeräschen in der nicht infizierten Gruppe. Im weiteren Verlauf der Infektion kann diese offensichtlich unter anderem durch die hohe Aktivität der Makrophagen kontrolliert werden. Bei den weiblichen Individuen lag der Anteil der nicht infizierten Gruppe und in der Infektionsklasse 1 nahezu gleich hoch, was bedeutet, dass es entweder zu keiner Infektion kam, oder diese erfolgreich bekämpft wurde. Der Anteil in der Infektionsklasse 2 war demgegenüber sehr gering (13,3%).

Weibliche und juvenile Meeräschen haben also im Gegensatz zu ihren männlichen Artgenossen durch die erhöhte Aktivität der Makrophagen einen geringeren Anteil in der Infektionsklasse 2.

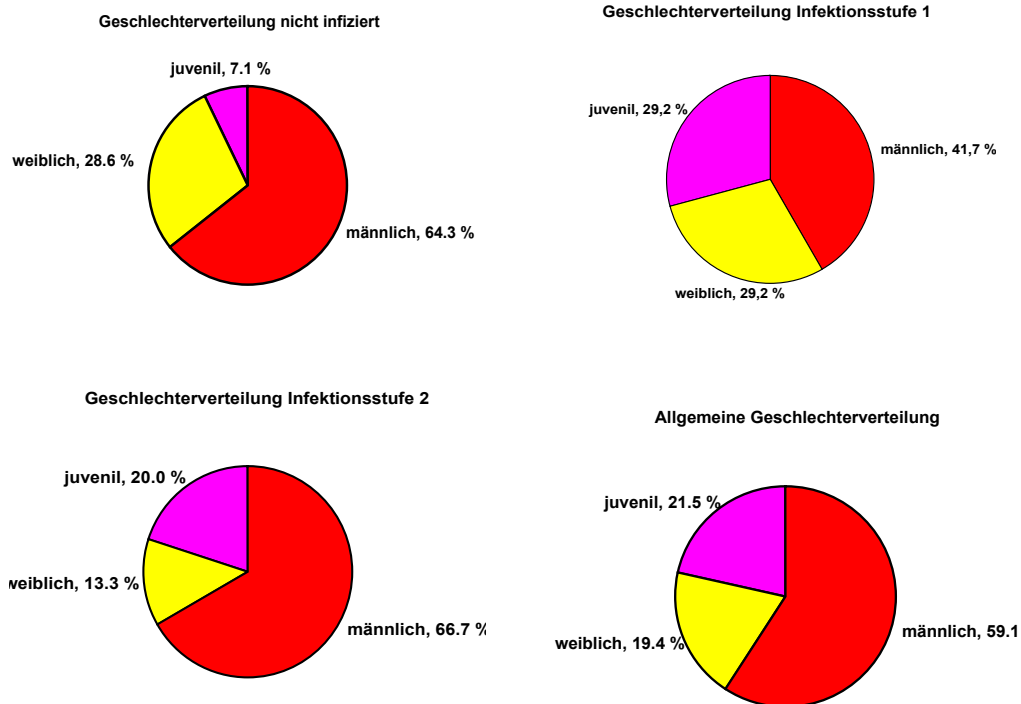


Abb. 5.12: Verteilung der Geschlechter auf die einzelnen Infektionsklassen, sowie die allgemeine Geschlechterverteilung der Meeräschen auf beiden untersuchten Stationen.

In den Meeräschen konnte eine höhere Aktivität der MA-SP in der Leber weiblicher und juveniler Fische, verglichen mit der MA-SP Aktivität in männlichen Fischen nachgewiesen werden. Die Unterschiede in der Aktivität waren statistisch signifikant (Kruskal-Wallis ANOVA  $p < 0,005$ , Abb. 5.13).

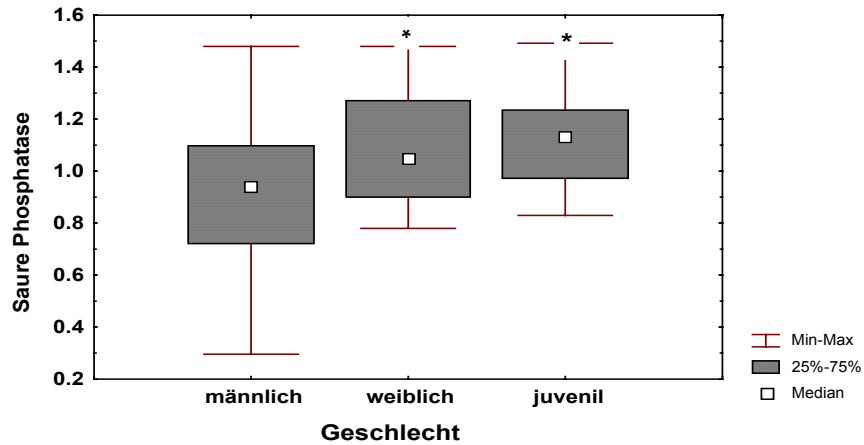


Abb. 5.13.: Saure Phosphatase Aktivität in den Makrophagen Aggregaten männlicher, weiblicher und juveniler Meeräschen.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der nächsten Abbildung wieder:

Der Anteil von Meeräschen mit Infektionsklasse 2, das heißt der Klasse, in der die Einzeller in der Leber zur Sporulation kamen, war in der Gruppe der männlichen Fische am höchsten und in der Gruppe der weiblichen Fische am niedrigsten (Abb. 5.14).

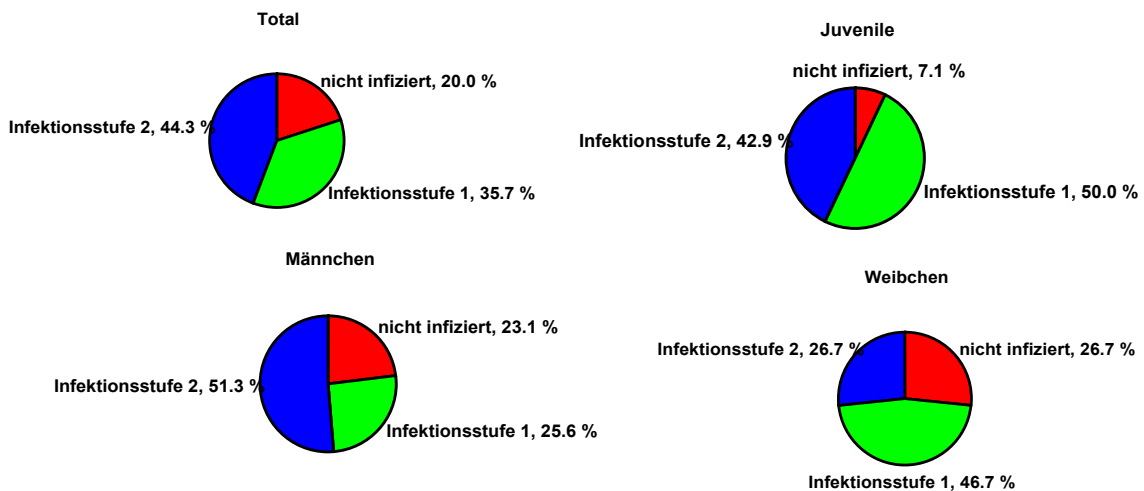


Abb. 5.14: Prozentualer Anteil der Infektionsklassen an den untersuchten Meeräschen allgemein sowie in männlichen, weiblichen und juvenilen Fischen.

Im Gegensatz dazu führte die signifikant höhere MA-SP Aktivität in Meeräschen von der Referenzstation, verglichen mit der belasteten Station nicht dazu, dass auf dieser Station weniger Individuen in der Infektionsklasse 2 zu finden waren. Ganz das Gegenteil war der Fall (Abb. 5.15). Während auf der Referenzstation Maagan Michael annähernd 60 % aller Fische der Infektionsklasse 2 angehörten, waren es auf der belasteten Station nur 30%. Auch Doppelinfektionen mit *Myxobolus* und *Sphaerospora* in der Galle der untersuchten Fische kamen auf der Referenzstation nahezu doppelt so häufig vor (20,8%), als auf der belasteten Station (10,9%).



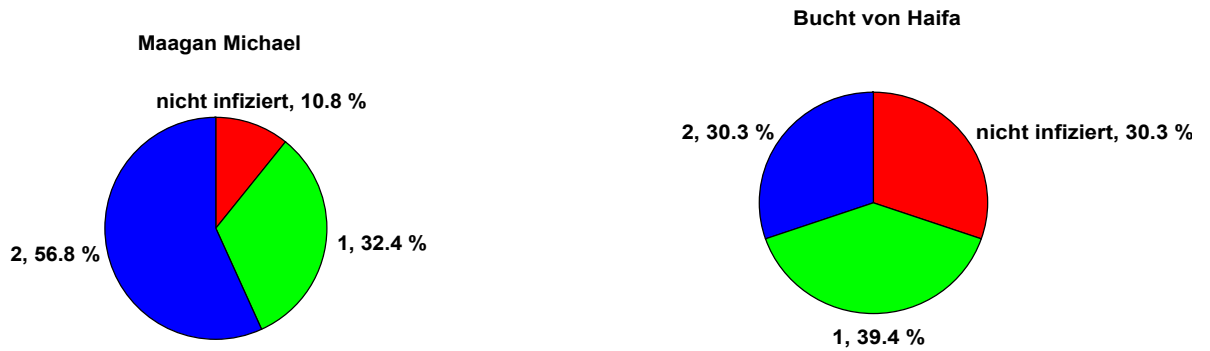


Abb. 5.15: Prozentuale Verteilung der Infektionsklassen auf den Gesamtpool der untersuchten Meeräschen auf beiden beprobten Stationen.

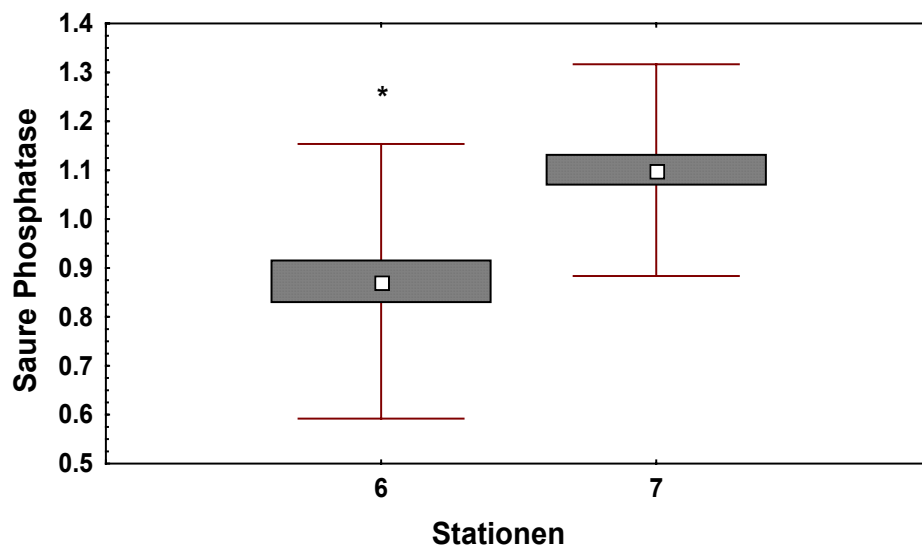


Abb.5.16: MA-SP Aktivität auf den beiden untersuchten Stationen. (6=Haifa Bay, belastet, 7=Maagan Michael, gering belastet), Mittelwerte und Standardabweichungen. Unterschiede sind statistisch signifikant (Mann-Whitney U Test,  $p < 0,05$ ).

## *Schlussfolgerung*

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, reagiert das nicht-spezifische Immunsystem in der Leber von Meeräschen auf vielfältige Art und Weise auf die Infektion mit *Myxobolus*. Besonders hervorzuheben sind die Aktivitäten der Sauren Phosphatase und der iNOS in MA. Eine Suppression dieser Funktionen durch Schadstoffbelastung müsste demnach auch eine verstärkte Infektionsanfälligkeit von Fischen auf der anthropogen belasteten Station zur Folge haben. Das war aber, wie in diesem Kapitel beschrieben wurde, nicht der Fall. Es bleibt also die Frage:

***Wie kommt es, dass bei einem höheren Infektionsdruck von Myxosporidien in Fischen der belasteten Station geringere Prevalenzen von Leberinfektionen zu beobachten waren?***

### Hypothese 1

*Die Schadstoffbelastung in der Leber ist so hoch, dass die Parasiten nicht in die Leber einwandern.*

Für eine *Myxobolus*art (*Myxobolus* M) war es tatsächlich so, dass sie in hochbelasteten Meeräschen weniger häufig vorkam, als in gering belasteten. In Belastungsstufe 3 waren diese nahezu gar nicht mehr nachzuweisen. Die andere *Myxobolus*art (*Myxobolus* G) verhielt sich genau entgegengesetzt. Sie kam in höher belasteten Fischen vermehrt vor. Für die Infektion mit *Sphaerospora* wurde eine lineare Abnahme der Infektionsrate mit zunehmender Belastung festgestellt. Es scheint also tatsächlich so zu sein, dass die Belastung der Fische mit chlororganischen Schadstoffen eine Auswirkung auf die Parasiteninfektion hat, sei es auch indirekt durch den Wegfall von für die Fortpflanzung essentiellen Zwischenwirten. Dieser Einfluss war allerdings nicht einheitlich und kann daher nicht alleine die oben gestellte Frage erklären.

### Hypothese 2

*Andere Immunfunktionen, als die im Rahmen dieser Arbeit untersucht sind verantwortlich für die erfolgreiche Abwehr der einzelligen Parasiten.*

In den selben Meeräschen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht worden sind, wurden parallel von der Arbeitsgruppe von Prof. Ron in Eilat auch andere Immunparameter untersucht. Ein wichtiger Parameter für die nicht zelluläre, unspezifische Immunabwehr ist die Aktivität von Lysozym im Blut der Fische. Die Lysozymaktivität war in den Mugiliden der belasteten Station signifikant höher, als in Fischen der gering belasteten Referenzstation (Abb. 5.17).

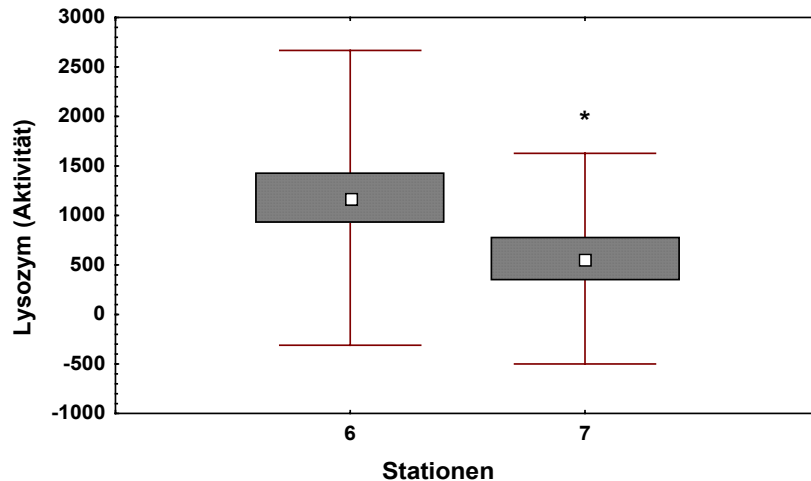


Abb. 5.17: Lysozymaktivität im Blut von Meeräschen aus beiden untersuchten Stationen. Daten von Prof. B. Ron, Eilat, erhoben an den selben Fischen, die in dieser Arbeit untersucht worden sind.

### Hypothese 3

*Es existiert ein Zusammenhang zwischen Induktion der Biotransformation (CYP1A1) und der Aktivität der nicht-spezifischen Immunantwort*

Ein Parameter, der in den belasteten Fischen induziert war, ist die Aktivität der CYP1A1 EROD. Studien zum Zusammenhang zwischen Biotransformation und nicht spezifischer Immunantwort in der Leber von Steinbutt haben gezeigt, dass mit Induktion der CYP1A1 durch Modellinduktoren ( $\beta$ -NF) auch die Reaktionen der nicht spezifischen Immunantwort stimuliert wurden (Broeg et al., eingereicht). In Kapitel 1 dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass Makrophagen aus einer Kopfnierenzellsuspension der Flunder in Fischen der belasteten Station bereits ohne vorherige Stimulierung mit PMA aktiviert waren. Dadurch könnte es zu einem „Vorsprung“ der Immunabwehr gegenüber einwandernden Parasiten kommen, da die Abwehr bereits stimuliert ist und nicht erst aktiviert werden muss. Ist das Immunsystem schon „vorinduziert“, kann es unter Umständen effektiver vorgehen.

Ein Zusammenhang zwischen Biotransformation und Aktivierung des Immunsystems existiert, die Mechanismen dieses Zusammenhangs sind allerdings nicht aufgeklärt (Broeg et al., eingereicht, Xiang und Rice, 2000).

### Hypothese 4

*G6PDH im Lebergewebe ist unter Schadstoffeinfluss induziert. Die hohe Aktivität dieses Enzyms bildet eventuell einen generellen Schutzmechanismus des Lebergewebes, gegenüber allen destrukturierenden Einflüssen in der Leber, auch dem Eindringen von Parasiten.*

### Hypothese 5

*Kupfer könnte ein Schlüsselschadstoff für die Suppression der nicht spezifischen Immunantwort bei Fischen am Referenzstandort sein.*

Kupfer ist der einzige analysierte Schadstoff, dessen Konzentration in den untersuchten Fischen der Referenzstation höher war, als in den Mugiliden der belasteten Station. Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, sank die Aktivität der NOS in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration. Da die NOS, wie hier gezeigt, auch besonders in den Zellen des

Gallengangepithels aktiv war, durch die die Einwanderung der Einzeller in die Leber stattfinden könnte, würde eine herabgesetzte Aktivität dieses Enzyms zu einer verstärkten Einwanderung von Einzellern führen und somit den Schlüssel für die oben aufgeworfenen Frage darstellen. Ein anderer, möglicher Weg der Weiterleitung von Myxosporidien-Stadien ist der über den Blutstrom. Da auch in den Endothelien NOS-Aktivität nachgewiesen wurde, könnte auch die Einwanderung über diesen Weg bei NOS-Hemmung durch Kupfer für die Parasiten erleichtert sein.

Wie bei den Flundern in der Nordsee festgestellt wurde, werden 52% der Gesamtvarianz der MA-SP Aktivität durch die Konzentration von Kupfer im Fischgewebe bestimmt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Kupfer für die Immunmodulation in Fischen eine tragende Rolle spielt.

## Kapitel 6

### Belastung und Parasiteninfektion- Ist eine Nutzung der Makrophagenparameter als Biomarker für anthropogene Belastung unter diesen Umständen möglich?

*Vergleich zwischen nicht infizierten Meeräschen der belasteten und der gering belasteten Station*

#### MA-SP und -Größe

In den nicht infizierten Fischen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Aktivität der MA-SP zwischen den Fischen von der belasteten Station und denen der gering belasteten Station festgestellt werden. Die Aktivität war in den Meeräschen der gering belasteten Station nur geringfügig höher, als in Fischen der belasteten Station (Abb.6.1). Betrachtete man allerdings nur die Kampagne 1 (Frühjahr 1999), in der die Infektionslage auf beiden Stationen annähernd gleich war, so zeigten sich doch deutliche Unterschiede zwischen der belasteten und der gering belasteten Station in Hinblick auf die Aktivität der Sauren Phosphatase (Abb. 6.2).

MA in Fischen aus dem gering belasteten Gebiet waren größer, als Aggregate aus Individuen der hoch belasteten Haifa Bay (Abb. 6.3). Auch hier gilt, dass die Unterschiede nicht statistisch signifikant waren. Die mittlere Anzahl von Makrophagen Aggregaten in der Leber der untersuchten Meeräschen war auf der gering belasteten Station signifikant höher, als auf der belasteten Station (Abb. 6.4).

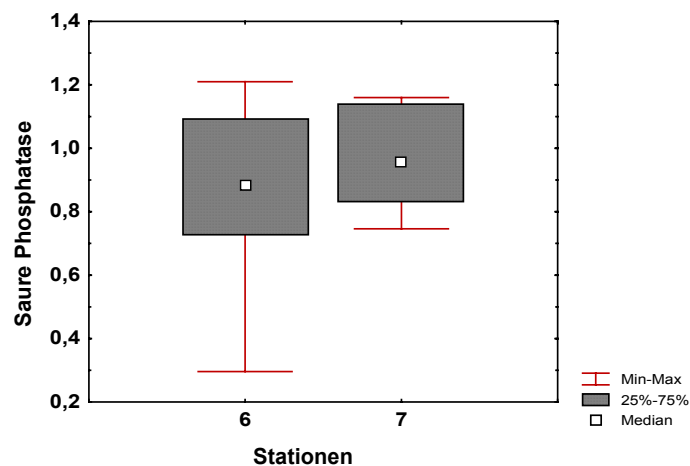


Abb. 6.1: Aktivität der Sauren Phosphatase (Absorbtion) in Makrophagen Aggregaten von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in nicht infizierten Fischen (Alle Kampagnen gemeinsam betrachtet). Die Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p > 0,05$ ).

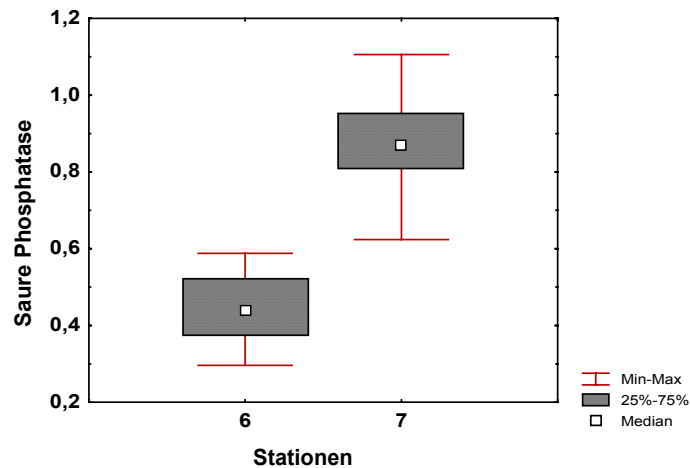


Abb. 6.2: MA-SP Aktivität (Absorption) in Makrophagen Aggregaten von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in nicht infizierten Fischen (Kampagne 1, März 1999). Eine statistische Beurteilung war aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl (n=3 pro Station) nicht möglich.

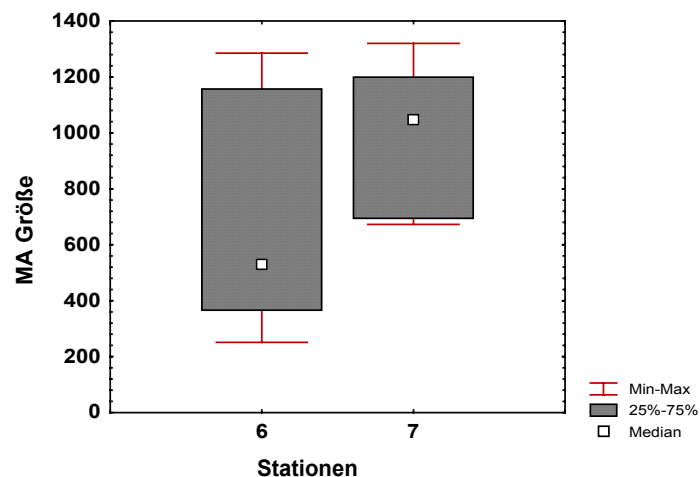


Abb. 6.3: Mittlere Größe der MA ( $\mu\text{m}^2$ ) von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in nicht infizierten Fischen aus allen Kampagnen. Die Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p > 0,05$ ).

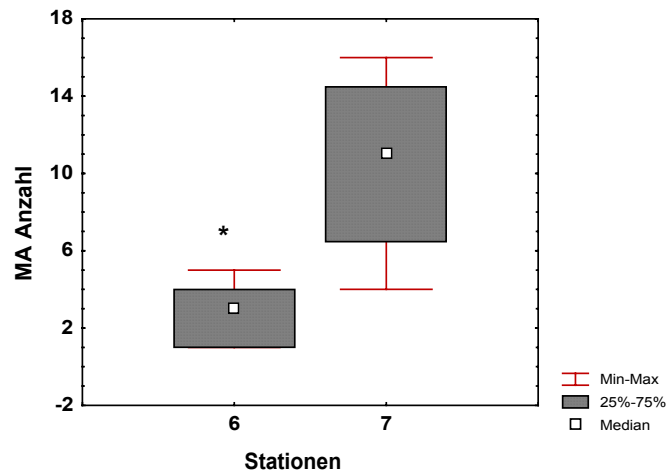


Abb. 6.4: Anzahl von MA in der Leber von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in nicht infizierten Fischen aus allen Kampagnen. Die Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ ).

### PGDH

Nicht infizierte Meeräschen der Referenzstation zeigten verglichen mit den Fischen von der belasteten Station eine signifikant höhere PGDH Enzymaktivität in den Makrophagen Aggregaten (Abb. 6.5). Im Lebergewebe hingegen wurden vergleichbare Enzymaktivitäten in beiden Gruppen gemessen (Abb.6.6).

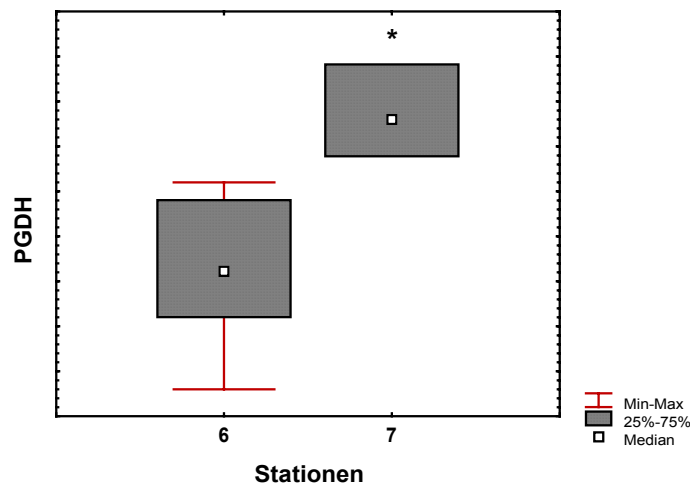


Abb. 6.5: Aktivität der PGDH (Absorbtion) in MA von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in nicht infizierten Fischen (Alle Kampagnen gemeinsam betrachtet). Die Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ , \*).

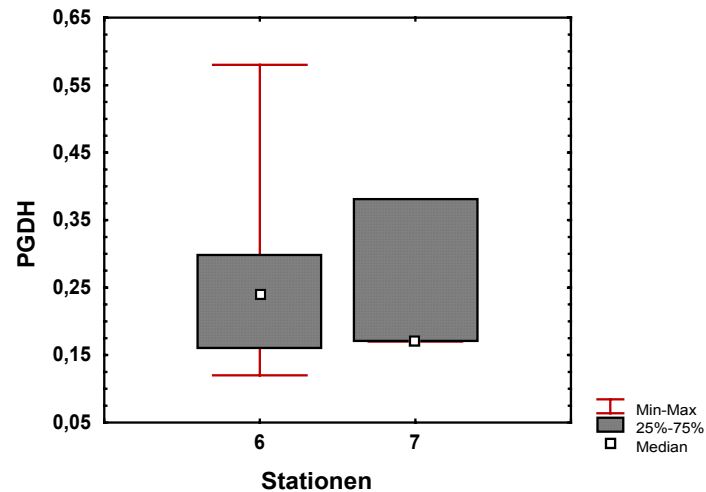


Abb. 6.6: Aktivität der PGDH (Absorbtion) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in nicht infizierten Fischen (Alle Kampagnen gemeinsam betrachtet). Die Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p > 0,05$ ).

### G6PDH

Die Aktivität der G6PDH war in Aggregaten nicht infizierter Fische der Referenzstation höher, als in Mugiliden der belasteten Station. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant (Abb. 6.7). Im Gegensatz dazu wurde im Lebergewebe belasteter Fische eine signifikant höhere Enzymaktivität ermittelt, als in den Leberzellen gering belasteter Individuen ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney U-Test, Abb. 6.8).

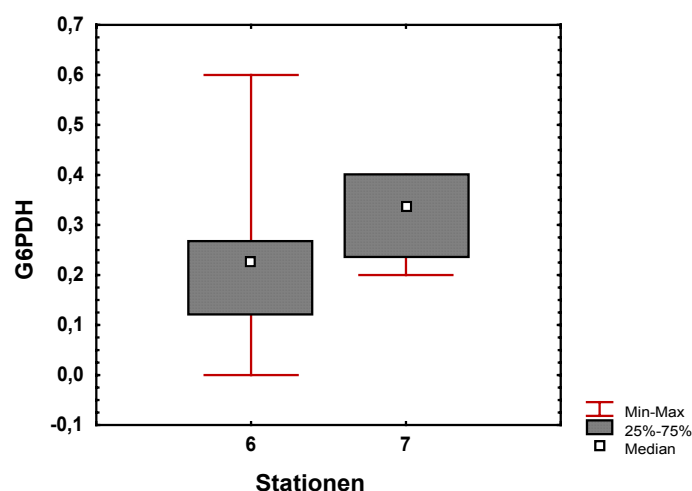


Abb. 6.7: Aktivität der G6PDH (Absorbtion) in Makrophagen Aggregaten von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in nicht infizierten Fischen (Alle Kampagnen gemeinsam betrachtet). Die



Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p > 0,05$ ).

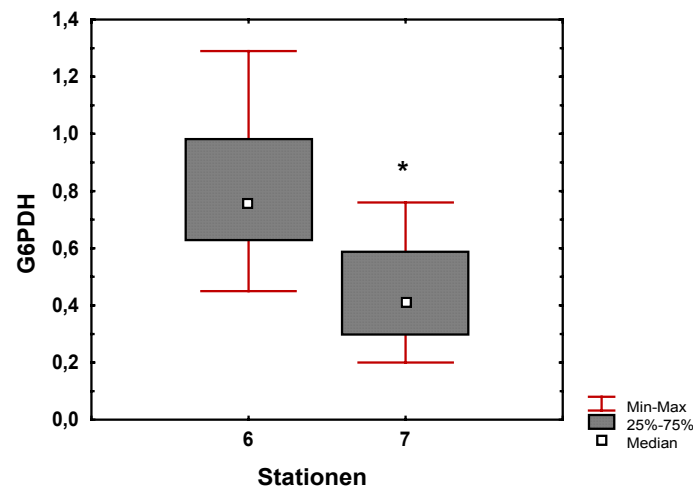


Abb. 6.8: Aktivität der G6PDH (Absorbtion) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in nicht infizierten Fischen (Alle Kampagnen gemeinsam betrachtet). Die Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ , \*).

### iNOS

Die Aktivität der induzierbaren NOS (iNOS) in der Leber nicht infizierter Meeräschen war höher in Fischen von der gering belasteten Station, als in den Fischen der hoch belasteten Station. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant (Abb. 6.9).

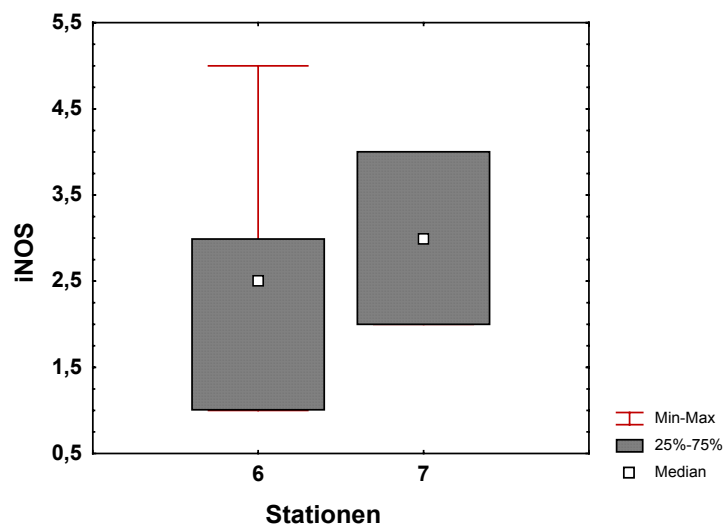


Abb. 6.9: Aktivität der iNOS (Absorbtion) in der Leber und den Makrophagen Aggregaten von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in nicht infizierten Fischen (Alle Kampagnen gemeinsam betrachtet). Die Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p > 0,05$ ).

### Lysosomenstabilität

Die Lysosomenstabilität war in nicht infizierten Meeräschen der belasteten Station verglichen mit nicht infizierten Fischen von der gering belasteten Station signifikant erniedrigt. Dies betraf allerdings nur die Lysosomenpopulation, die mit dem 2. „peak“ (LYS2) gemessen wurden (Abb. 6.11). Bei den Lysosomen, die mit dem 1. „peak“ gemessen wurden (LYS1) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Stationen festgestellt werden, wobei aber auch dort die Fische der belasteten Station niedrigere Lysosomenmembranstabilität zeigten (Abb. 6.10).

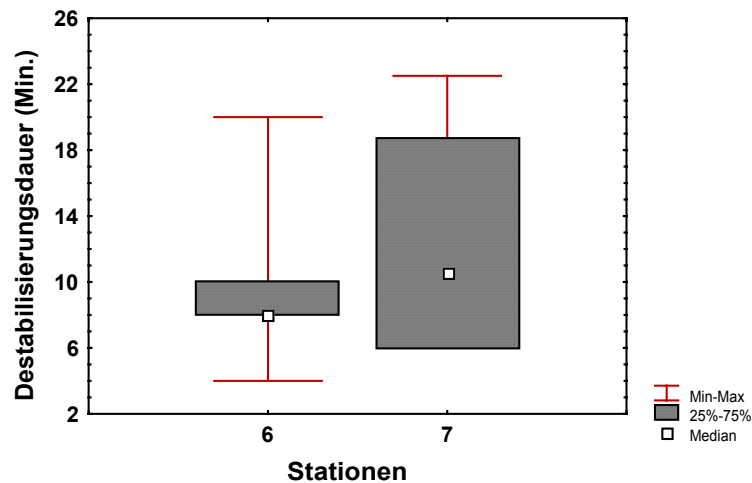


Abb. 6.10: Lysosomenstabilität (1. Peak) im Lebergewebe von nicht infizierten *Liza aurata* aus der belasteten Bucht von Haifa (6) und dem Referenzgebiet (7). Die Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p > 0,05$ ).

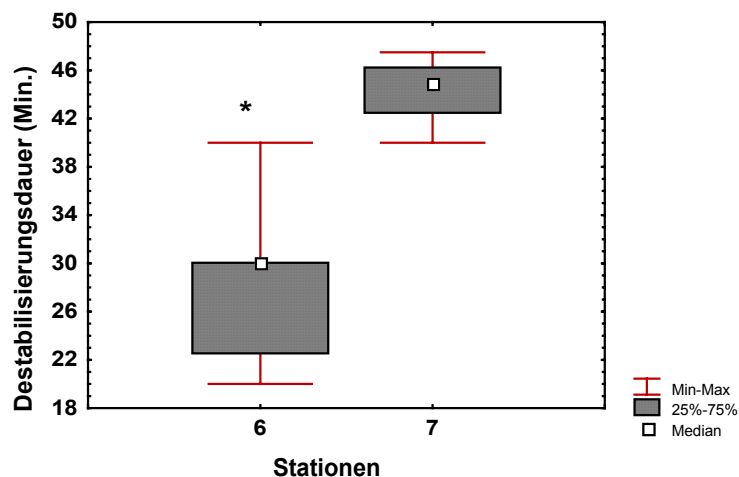


Abb. 6.11: Lysosomenstabilität (2. peak) im Lebergewebe von nicht infizierten *Liza aurata* aus der belasteten Bucht von Haifa (6) und dem Referenzgebiet (7). Der Unterschied zwischen den Stationen ist statistisch hochsignifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,001$ , \*).

## EROD

Die EROD Aktivität war in nicht infizierten Fischen der belasteten Station signifikant höher, als in nicht infizierten Meeräschen, die auf der Referenzstation gefischt wurden (Abb. 6.12).

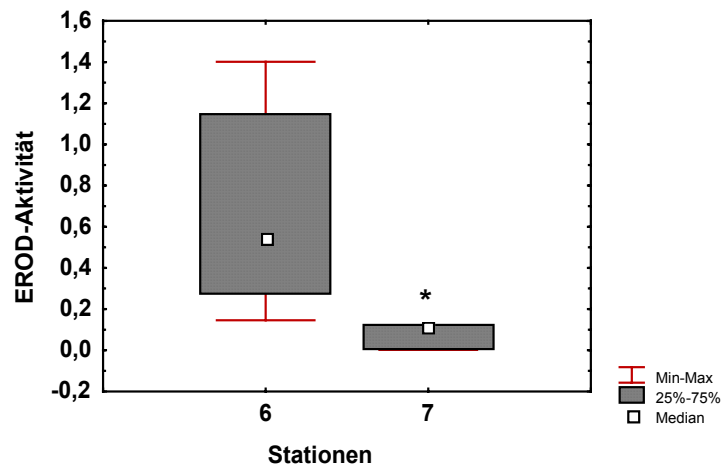


Abb. 6.12: EROD-Aktivität (nmol Resorufin/mg Protein/min) im Lebergewebe von nicht infizierten *Liza aurata* aus der belasteten Bucht von Haifa (6) und dem Referenzgebiet (7). Der Unterschied zwischen den Stationen ist statistisch hochsignifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,001$ , \*).

## Konditionsfaktor/ Lebersomatischer Index (LSI)

Bei den nicht infizierten Meeräschen wurde kein Unterschied im Konditionsfaktor zwischen der belasteten und der gering belasteten Gruppe festgestellt. Es gab also einen gemeinsamen „Grundwert“ in nicht infizierten Fischen beider Stationen. Die Infektion führte bei den Fischen der belasteten Station sofort zu einer Abnahme des Konditionsfaktors, was bei den Individuen der Referenzstation nicht beobachtet wurde.

Der Lebersomatische Index hingegen war bei den Mugiliden von der Referenzstation signifikant niedriger, als bei Fischen aus dem belasteten Gebiet (Abb. 6.13). Belastete Individuen hatten einen nahezu doppelt so hohen Lebersomatischen Index, als die Fische aus dem Referenzgebiet. Dies wurde auch bei den infizierten Meeräschen festgestellt.

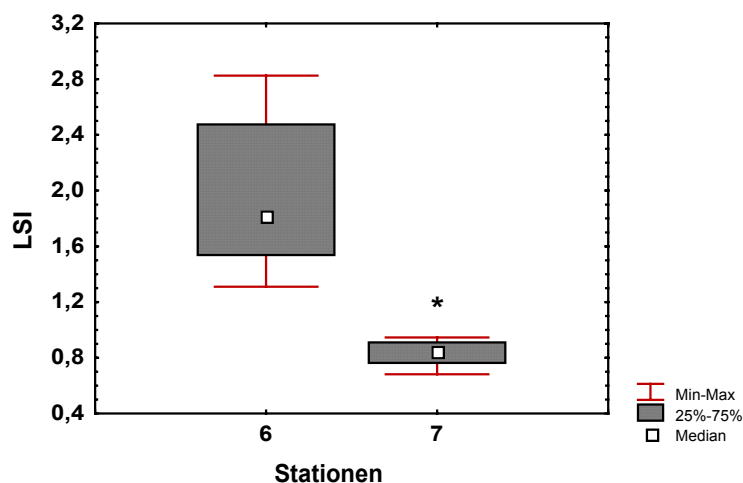


Abb. 6.13: Lebersomatischer Index (LSI) in nicht infizierten *Liza aurata* aus der belasteten Bucht von Haifa (6) und dem Referenzgebiet (7). Der Unterschied zwischen den Stationen ist statistisch hochsignifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,001$ , \*).

### Schadstoffbelastung

Die Belastung mit chlororganischen Schadstoffen war in nicht infizierten Meeräschen von der belasteten Station höher, zum größten Teil sogar signifikant höher als in Individuen der gering belasteten Station, wie hier anhand der Konzentration von PCB 153 im Muskelgewebe beispielhaft demonstriert wird (Abb. 6.14).

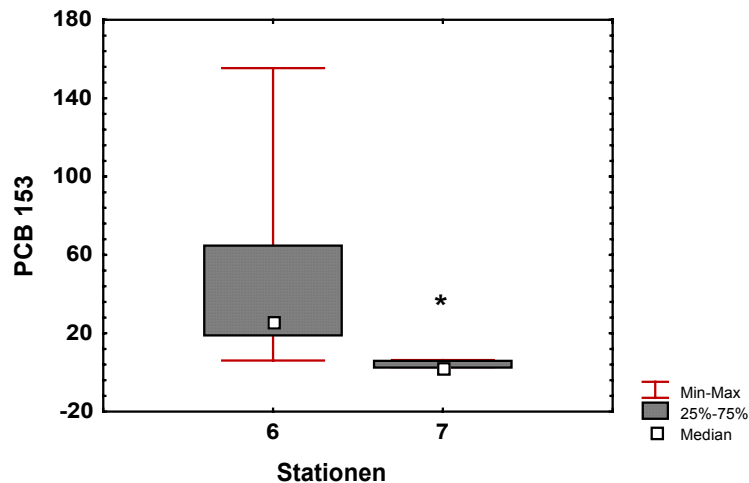


Abb. 6.14: Konzentration von PCB 153 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht) im Muskelgewebe von nicht infizierten *Liza aurata* aus der belasteten Bucht von Haifa (6) und dem Referenzgebiet (7). Der Unterschied zwischen den Stationen ist statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ , \*).

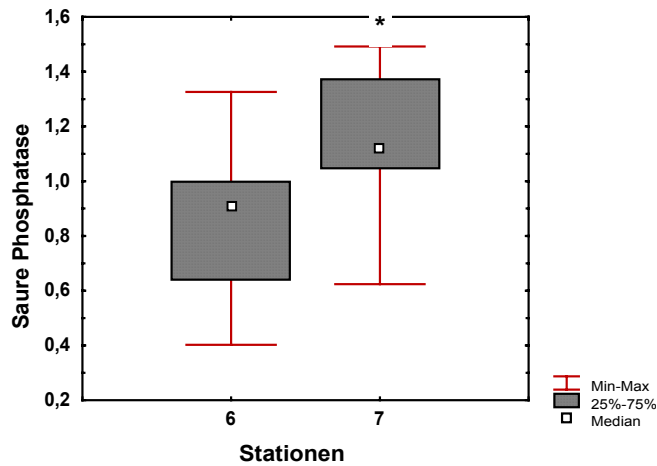
Die Belastung von Kupfer hingegen war auf beiden Stationen annähernd gleich. Bei gleichem, relativ niedrigem Kupfergehalt war in Fischen beider Stationen keine Infektion festzustellen (vergleiche auch Kapitel 6 und 3).

*Vergleich zwischen infizierten Meeräschen (Infektionsklasse 1) der belasteten und der gering belasteten Station*

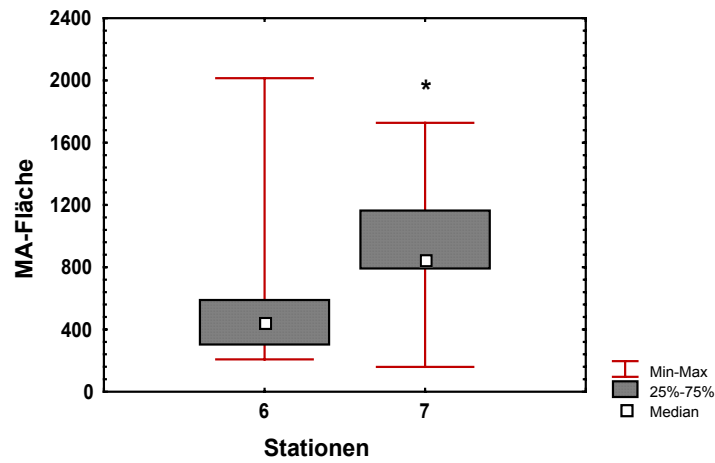
### MA-SP und -Größe

Die Saure Phosphatase war in infizierten Mugiliden der unbelasteten Station signifikant höher, als in Fischen der belasteten Station ( $p < 0,01$ , Mann-Whitney U-Test, Abb. 6.15). Ebenso verhielt es sich mit der Größe der Aggregate die in infizierten Individuen der unbelasteten Station größer war, als in Meeräschen der belasteten Station. Außerdem wurden in den infizierten Fischen der gering belasteten Station signifikant mehr Makrophagen Aggregate pro  $\mu\text{m}^2$  Lebergewebe gezählt, als in den Fischen der belasteten Station.

A



B



C

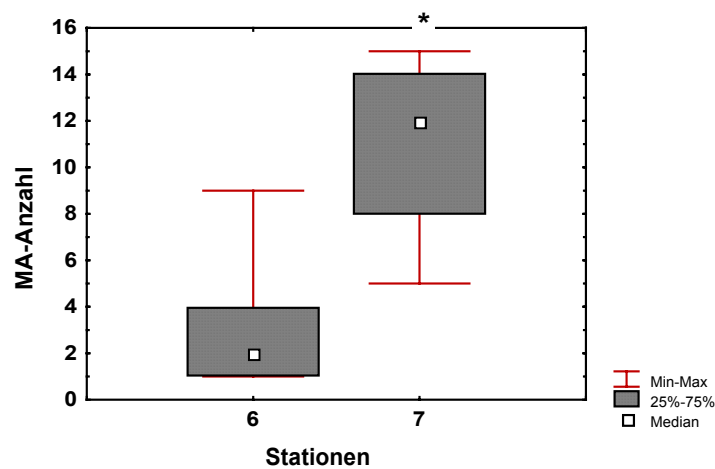


Abb. 6.15: MA-SP Aktivität (Absorbtion (A)), Größe der Makrophagen Aggregate ( $\mu\text{m}^2$ ), (B) und Anzahl von Aggregaten pro  $\text{mm}^2$  (C) im Lebergewebe von infizierten *Liza aurata* (Infektionsklasse 1) aus der belasteten Bucht von Haifa (6) und dem Referenzgebiet (7). Der Unterschied zwischen den Stationen ist in allen Fällen statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ , \*).

### PGDH

Für dieses Enzym des Pentose Phosphat Zyklus wurde eine signifikant höhere Aktivität in Aggregaten infizierter Meeräschen der Referenzstation, verglichen mit Fischen aus der belasteten Station gemessen (Abb. 6.16). Im Lebergewebe hingegen war die Aktivität in den gering belasteten Fischen niedriger, dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

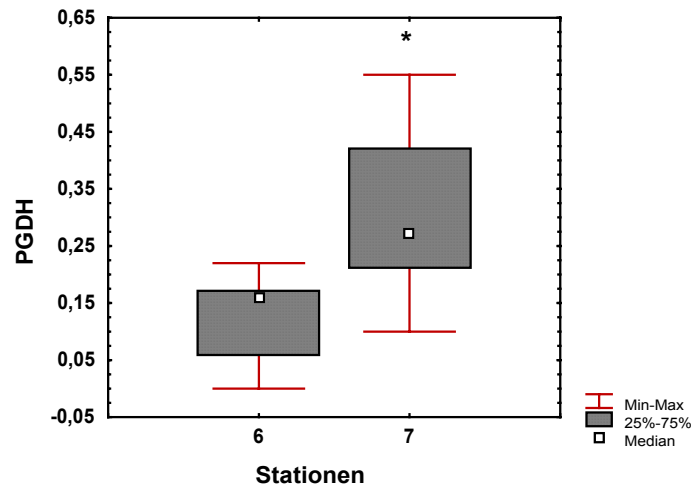


Abb. 6.16: PGDH Aktivität (Absorption) in Makrophagen Aggregaten von infizierten *Liza aurata* (Infektionsklasse 1) aus der belasteten Bucht von Haifa (6) und dem Referenzgebiet (7). Der Unterschied zwischen den Stationen ist statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ ).

### G6PDH

Die G6PDH-Aktivität war sowohl innerhalb der Makrophagen Aggregate, als auch im Lebergewebe in den infizierten Meeräschen der belasteten Station höher, als in den unbelasteten Fischen. Während dieser Unterschied in den Aggregaten nicht statistisch signifikant war, konnte er im Lebergewebe statistisch abgesichert werden ( $p < 0,01$ , Mann-Whitney U-Test, Abb. 6.17).

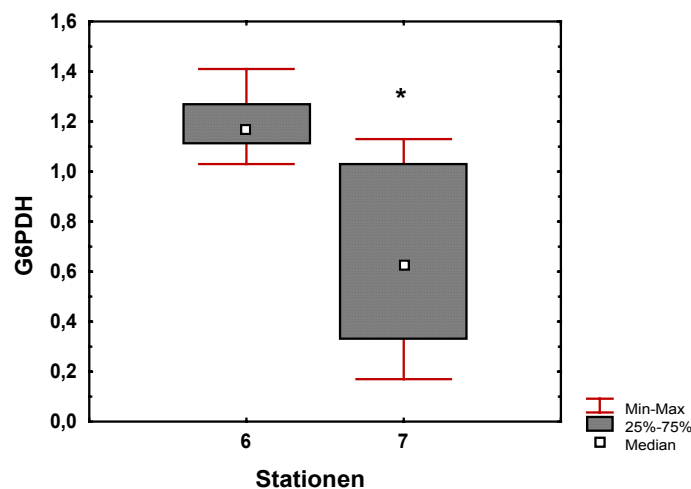


Abb. 6.17: Aktivität der G6PDH (Absorption) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in Fischen aus Infektionsklasse 1. Der Unterschied zwischen den Stationen ist statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ ).

### iNOS

Die Aktivität der induzierbaren NOS (iNOS) in der Leber infizierter Meeräschen von der gering belasteten Station war höher als in den Fischen der hoch belasteten Station. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

In Endothelien und Gallengängen der Leber konnte kein Unterschied zwischen den infizierten Fischen der belasteten und den Fischen von der gering belasteten Station festgestellt werden.

### Lysosomenstabilität

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Stabilität lysosomaler Membranen in Leberzellen infizierter Meeräschen zwischen beiden Stationen festgestellt werden. Dies galt sowohl für den ersten „peak“ (LYS1), als auch für den zweiten (LYS2). Das ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Aktivität der Makrophagen in der Leber, ebenso wie toxische Reaktionen auf Schadstoffeinfluss zu einer Schädigung der lysosomalen Membranen in Leberzellen führen können. In diesem Fall (infizierte Fische) konnte also die Messung der Lysosomenstabilität alleine keine Auskunft auf den Grad toxisch induzierter Leberschäden geben und war daher nicht für den Einsatz im biologischen Effektmonitoring geeignet.

### EROD

Die EROD Aktivität war zwar in infizierten Fischen der belasteten Station höher, als in Meeräschen der gering belasteten Station, allerdings konnte auch hier, ebenso wie bei der Lysosomenstabilität kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Berücksichtigt man die Tatsache, dass in den nicht infizierten Meeräschen mit niedrigerer Makrophagenaktivität ein signifikanter Unterschied zwischen den Stationen ermittelt wurde, muss davon ausgegangen werden, dass eine hohe Aktivität des Immunsystems zu einer Schädigung der Biotransformation führen kann, ebenso wie eine starke Schädigung des Leberzellstoffwechsels aufgrund von Schadstoffeinfluß.

### Konditionsfaktor/ Lebersomatischer Index (LSI)

In den infizierten Fischen der unbelasteten Station wurde ein signifikant höherer Konditionsfaktor in Verbindung mit einem signifikant niedrigerem Lebersomatischen Index beobachtet (Abb. 6.18 A und B).

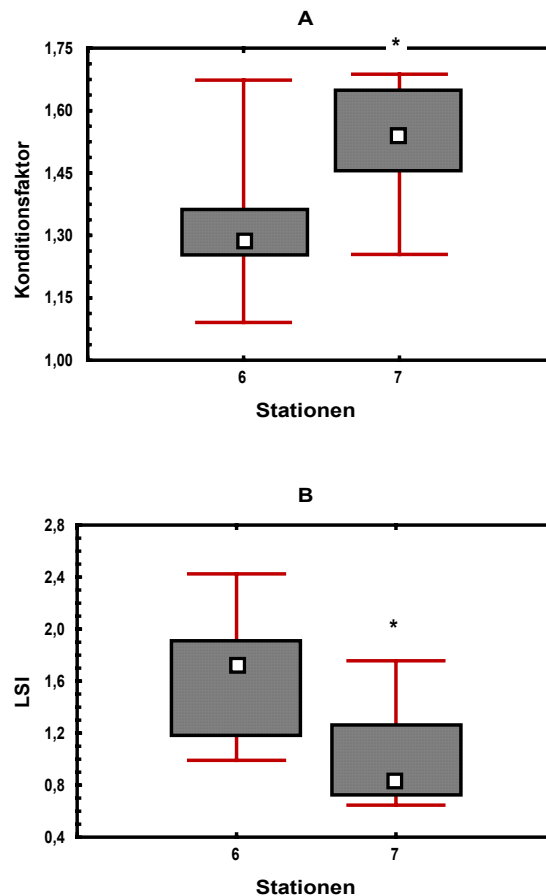


Abb. 6.18: Konditionsfaktor (A) und Lebersomatischer Index (LSI, B) von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael (7) und der hoch belasteten Bucht von Haifa (6) in Fischen aus Infektionsklasse 1. Die Unterschiede zwischen den Stationen sind statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ ).

### Schadstoffe

Der Gehalt an Chlorkohlenwasserstoffen im Muskelgewebe war in den infizierten Meeräschen der belasteten Station in allen Fällen signifikant höher, als in den Fischen der gering belasteten Station. Die Belastung mit Kupfer war in beiden Gruppen annähernd gleich, wobei in infizierten Individuen der gering belasteten Station eine etwas höhere Kupferkonzentration nachgewiesen wurde.

*Vergleich zwischen infizierten Meeräschen (Infektionsklasse 2, Zystenstadium) der belasteten und der unbelasteten Station*

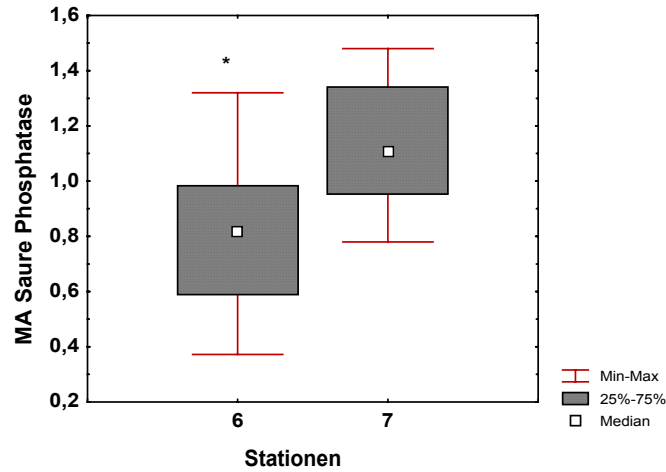
### MA-SP und -Größe

Die MA-SP Aktivität war wie bei den Meeräschen der Infektionsklasse 1 im belasteten Gebiet signifikant niedriger, als im gering belasteten Gebiet. Die Aggregate waren in Fischen aus dem Referenzgebiet nur geringfügig größer. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

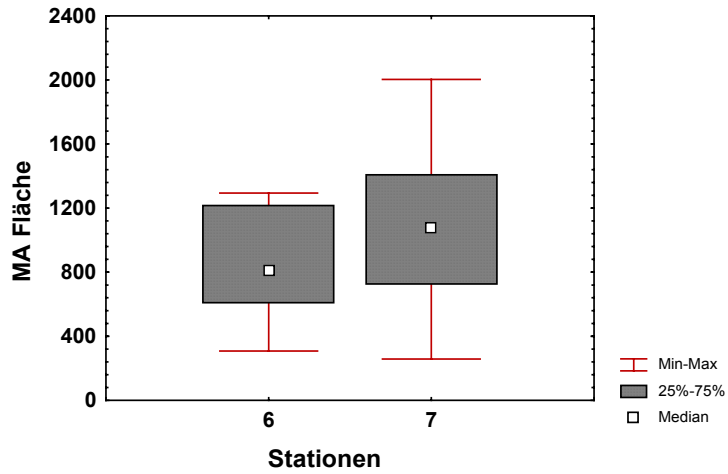
Die Anzahl von MA pro  $\text{mm}^2$  Lebergewebe war wie in den Infektionsklassen 0 und 1 in den gering belasteten Fischen signifikant höher, als in Meeräschen von der hochbelasteten Station (Abb. 6.19).



A



B



C

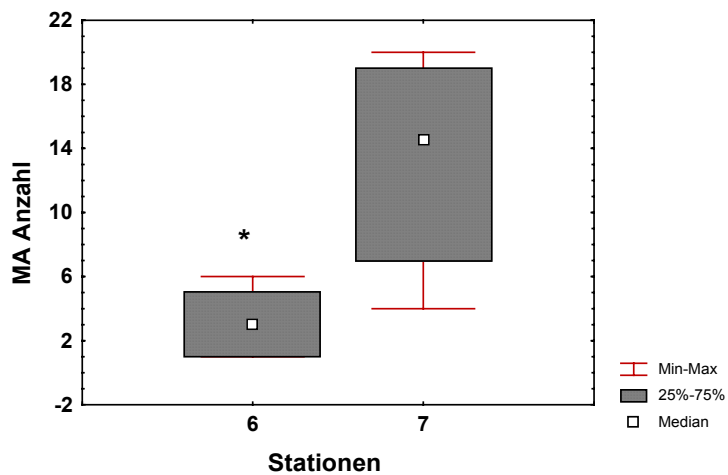


Abb. 6.19: MA-SP Aktivität (Absorbtion (A)), Größe der MA ( $\mu\text{m}^2$ ), (B) und Anzahl von Aggregaten pro  $\text{mm}^2$  (C) im Lebergewebe von infizierten *Liza aurata* (Infektionsklasse 2) aus der belasteten Bucht von Haifa (6) und dem Referenzgebiet (7). Der Unterschied zwischen den Stationen ist bei A und C statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ , \* und bei B nicht statistisch signifikant).

## PGDH

Wie in der ersten Infektionsklasse, so konnte auch hier eine signifikant höhere Enzymaktivität der PGDH in Makrophagen Aggregaten der Referenzfische, verglichen mit Individuen aus der belasteten Station gemessen werden (Abb. 6.20). Im Lebergewebe war die PGDH Aktivität in beiden Gruppen annähernd gleich.

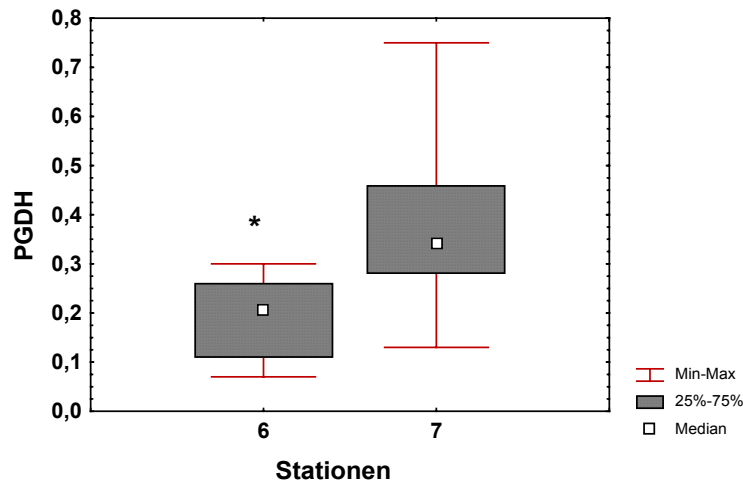


Abb. 6.20: PGDH Aktivität (Absorption) in MA infizierter *Liza aurata* (Infektionsklasse 2) aus der belasteten Bucht von Haifa (6) und dem Referenzgebiet (7). Der Unterschied zwischen den Stationen ist statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ ).

## Lysosomenstabilität

Die Stabilität lysosomaler Membranen war sowohl was den ersten, als auch den zweiten Peak anbelangt höher in Leberzellen der infizierten Referenzfische. Dieser Unterschied zu den belasteten Individuen war allerdings nicht signifikant.

## EROD-Aktivität

Die EROD Aktivität war in den Fischen der belasteten Station signifikant höher, als in Fischen der gering belasteten Referenzstation.

Ergebnisse der Biomarker (Lysosomenmembranstabilität und EROD) deuten darauf hin, dass die Effekte der unspezifischen Immunreaktion auf das Lebergewebe in dieser zweiten Klasse der Infektion geringer sind, als in der ersten Infektionsklasse.

## *Vergleich zwischen infizierten und nicht infizierten Meeräschen auf den jeweiligen Stationen*

### MA-SP und -Größe

#### Gering belastete Fische

In den Meeräschen der gering belasteten Station kam es in der Infektionsklasse 1 zu einer signifikanten Erhöhung der Sauren Phosphatase Aktivität, die auch in der 2. Infektionsklasse erhalten blieb (Abb. 6.21).

Die Makrophagen Aggregate vergrößerten sich in Fischen des Referenzgebietes im Verlauf der Infektion nicht (Abb. 6.22). Im Gegenteil kam es in Infektionsklasse 1 zu einer Verringerung der mittleren Größe, da einzelne Makrophagen in das Lebergewebe einwanderten und neue Aggregate bildeten. Diese Aggregate waren kleiner, als die Zentren, die im Lebergewebe schon länger phagozytotisch aktiv gewesen waren. In der 2.

Infektionsklasse kam es zu einer Vergrößerung der Makrophagen Aggregate. Diese war allerdings im Gegensatz zu den Mugiliden aus dem belasteten Gebiet nicht statistisch signifikant. Die Anzahl der MA stieg in beiden Infektionsklassen verglichen mit den nicht-infizierten Fischen an (Abb. 6.22b)

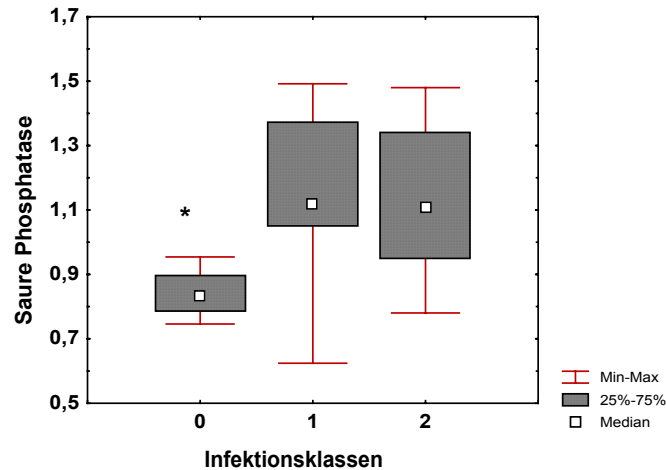


Abb. 6.21: Aktivität der Sauren Phosphatase (Absorbtion) in Makrophagen Aggregate von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen 1 und 2 und den nicht infizierten Fischen sind statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,01$ , \*).

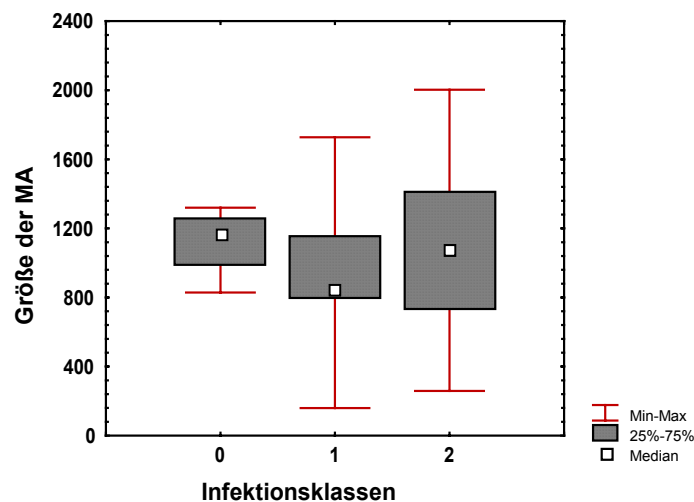


Abb. 6.22: Mittlere Größe der Makrophagen Aggregate von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

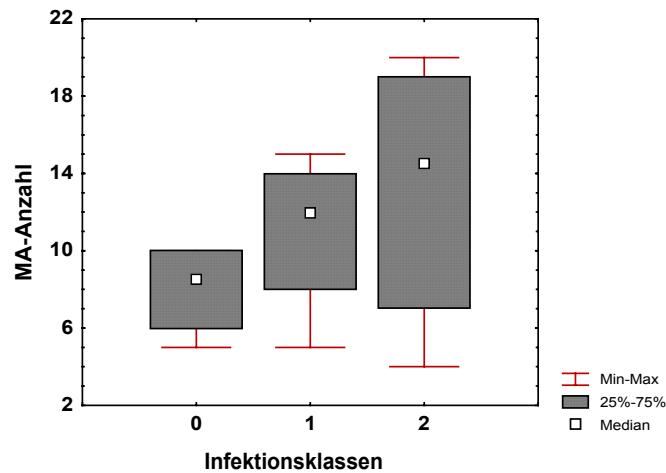


Abb. 6.22b: Anzahl der Makrophagen Aggregate in den Lebern von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

Die Anzahl der Makrophagen Aggregate pro  $\mu\text{m}^2$  Lebergewebe lag bei den Fischen aus dem Referenzgebiet in allen Infektionsklassen signifikant höher, als in den Individuen aus dem belasteten Gebiet.

#### Hoch belastete Fische

Während in den Fischen von der belasteten Station 6 keine signifikante Veränderung der Sauren Phosphatase Aktivität im Verlauf der Infektion festgestellt werden konnte (Abb. 6.23), wurde eine signifikante Vergrößerung der Aggregate in der zweiten Infektionsklasse-in der Zystenbildungsphase-beobachtet (Abb. 6.24).

Die Anzahl der MA änderte sich zwischen den einzelnen Infektionsklassen nicht (Abb. 6.24b).

Die Vergrößerung der MA kann als weiteres Indiz für eine Kompensation der herabgesetzten SP-Aktivität und eventuell auch geringen Zuwanderung von Makrophagen aufgrund von Schadstoffbelastung gewertet werden.

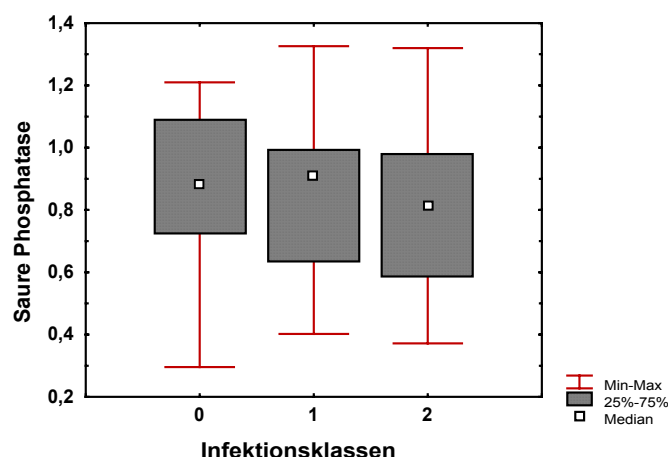


Abb. 6.23: MA-SP Aktivität (Absorbtion) von *Liza aurata* aus dem belasteten Gebiet der Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind nicht statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

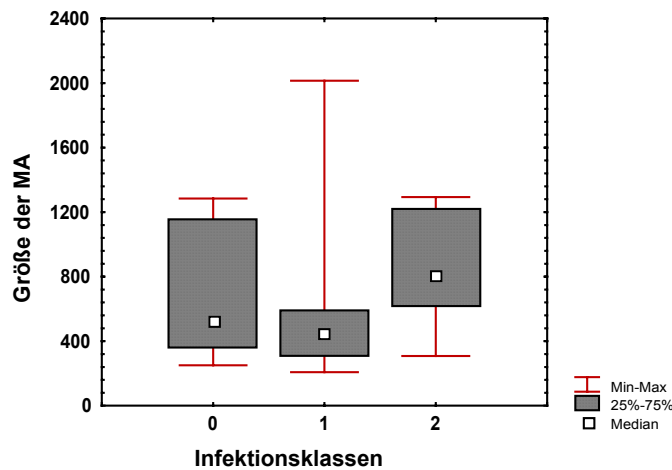


Abb. 6.24: Mittlere Größe der Makrophagen Aggregate von *Liza aurata* aus dem belasteten Gebiet der Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen Fischen in Klasse 1 und 2 sind statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ ).

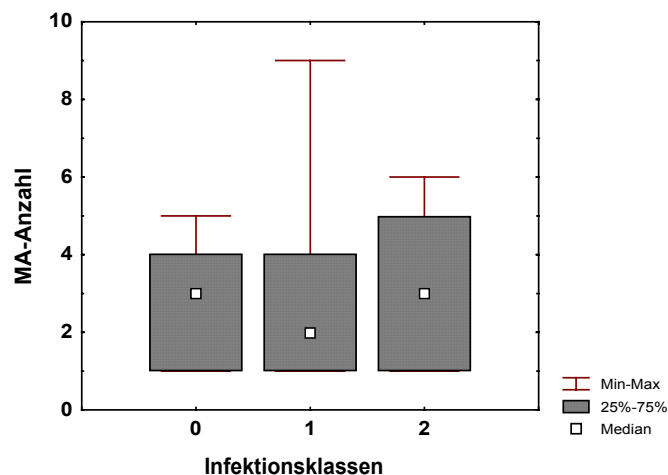


Abb. 6.24b: Anzahl der Makrophagen Aggregate in den Lebern von *Liza aurata* aus dem hoch belasteten Gebiet der Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

## PGDH

### Gering belastete Fische

Sowohl im Lebergewebe, als auch in den Makrophagen Aggregaten kam es im Verlauf der Infektion zu keiner signifikanten Änderung der PGDH Aktivität. Während im Gewebe eine Steigerung der Aktivität in Infektionsklasse 1, also von nicht infizierten zu infizierten Fischen festzustellen war (Abb. 6.25), blieb die Aktivität in den MA nahezu unverändert (Abb. 6.26).

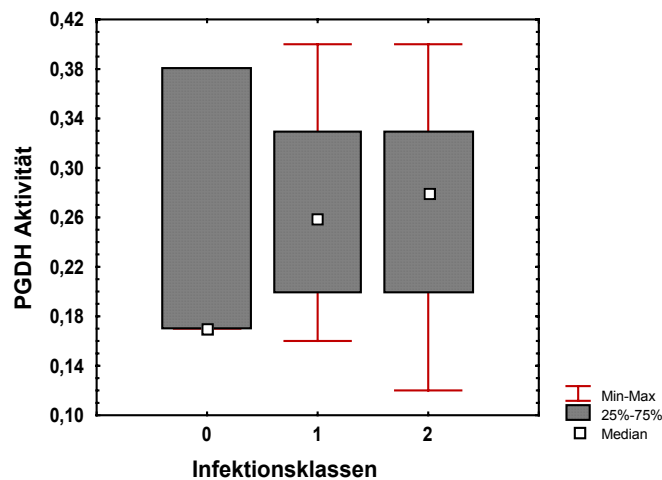


Abb. 6.25: Aktivität der PGDH (Absorbtion) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p>0,05$ ).

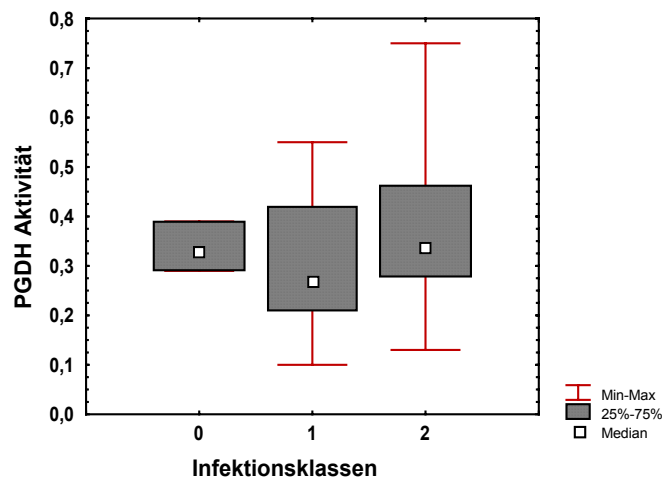


Abb. 6.26: Aktivität der PGDH (Absorbtion) in Makrophagen Aggregaten von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p>0,05$ ).

Vergleicht man die Aktivität zwischen Lebergewebe und Makrophagen Aggregaten, so ist diese in den Aggregaten höher (zwischen 0,25 und 0,35), als im Lebergewebe (zwischen 0,18 und 0,28).

## Hoch belastete Fische

Auf der belasteten Station konnte ebenfalls eine Erhöhung der PGDH Aktivität im Gewebe mit Einsetzen der Infektion festgestellt werden (Abb. 6.27). Wie in den gering belasteten Fischen war diese Steigerung der Aktivität allerdings nicht statistisch signifikant. Innerhalb der MA kam es in der 1. Infektionsklasse zu einer leichten Aktivitätsverringering, in Infektionsklasse 2 wurden nahezu identische Werte gemessen wie in den nicht infizierten Fischen (Abb. 6.28).

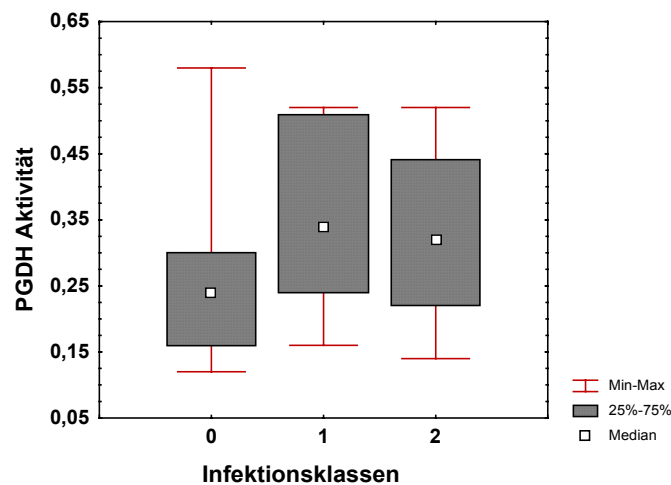


Abb. 6.27: Aktivität der PGDH (Absorbtion) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus der hoch belasteten Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p>0,05$ ).

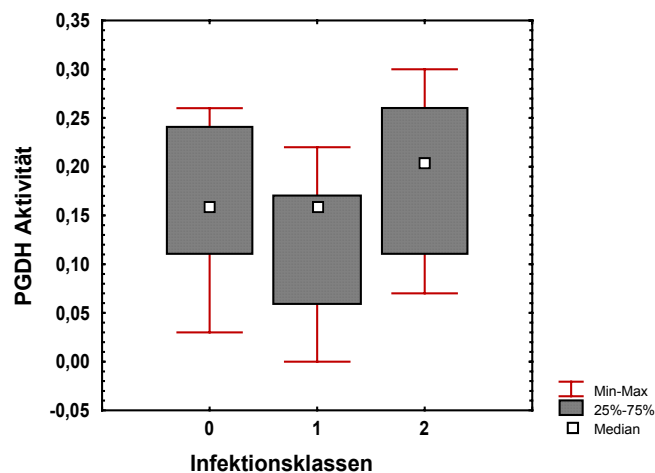


Abb. 6.28: Aktivität der PGDH (Absorbtion) in Makrophagen Aggregaten von *Liza aurata* aus der hoch belasteten Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p>0,05$ ).

## G6PDH

### Gering belastete Fische

Während die Aktivität der G6PDH in Makrophagen Aggregaten infizierter Meeräschen beider Infektionsklassen niedriger war (Abb. 6.30), als in den Aggregaten nicht infizierter Fische, konnte im Lebergewebe eine Aktivitätssteigerung in den infizierten Fischen festgestellt werden. Die Aktivität stieg schrittweise an mit den niedrigsten Werten in den nicht infizierten Fischen, gefolgt von den Meeräschen aus Infektionsklasse 1 und den höchsten Werten in Infektionsklasse 2 (Abb. 6.29).

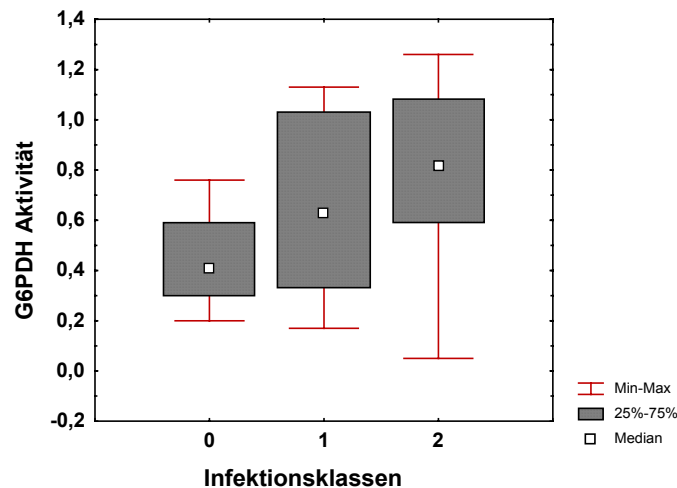


Abb. 6.29: Aktivität der G6PDH (Absorbtion) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).



Abb. 6.30: Aktivität der G6PDH (Absorbtion) in Makrophagen Aggregaten von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen 0 und 1 sind statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ ).



## Hoch belastete Fische

Auf der belasteten Station konnte sowohl im Gewebe, als auch in den Makrophagen Aggregaten eine Steigerung der Aktivität der G6PDH in Infektionsklasse 1 festgestellt werden. In der zweiten Infektionsklasse sank die Aktivität dann wieder. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Meeräschen und den Fischen der Infektionsklasse 1 waren im Lebergewebe statistisch signifikant (Abb. 6.31).

Vergleicht man die Enzymaktivität zwischen Lebergewebe und Makrophagen Aggregaten, so fällt auf, dass im Lebergewebe in allen Gruppen eine höhere Aktivität gemessen wurde, als in den Aggregaten. Besonders stark war der Unterschied in den Fischen von der gering belasteten Station, da dort die G6PDH Aktivität in den Makrophagen Aggregaten der infizierten Gruppen gegen 0 ging, während im Gewebe Enzymaktivitäten zwischen 0,6 und 0,8 gemessen wurden. Aber auch in Meeräschen von der belasteten Station gab es zwischen der Aktivität im Lebergewebe und in den Aggregaten große Unterschiede, die sich allerdings hauptsächlich dadurch begründeten, dass die Aktivität in den Leberzellen extrem hoch war. So wurden in der Infektionsklasse 1 Enzymaktivitäten um 1,1 im Lebergewebe gemessen, in den Aggregaten Werte um 0,4. Der Unterschied in der G6PDH Aktivität zwischen Leberzellen und Makrophagen betrug also ca. 0,7, dies entsprach dem Unterschied, der in den Fischen aus dem gering belasteten Gebiet beobachtet wurde.

Im Gegensatz dazu war im Lebergewebe der Meeräschen aus dem gering belasteten Gebiet insgesamt gesehen die Aktivität der PGDH signifikant höher, als in Fischen der belasteten Station (Abb. 6.33).

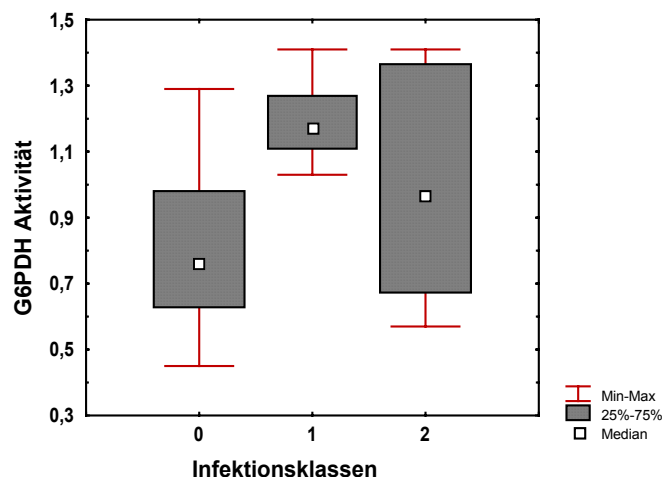


Abb. 6.31: Aktivität der G6PDH (Absorbtion) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus der hoch belasteten Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Der Unterschied zwischen den nicht infizierten Fischen und Fischen aus Infektionsklasse 1 ist statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ ).

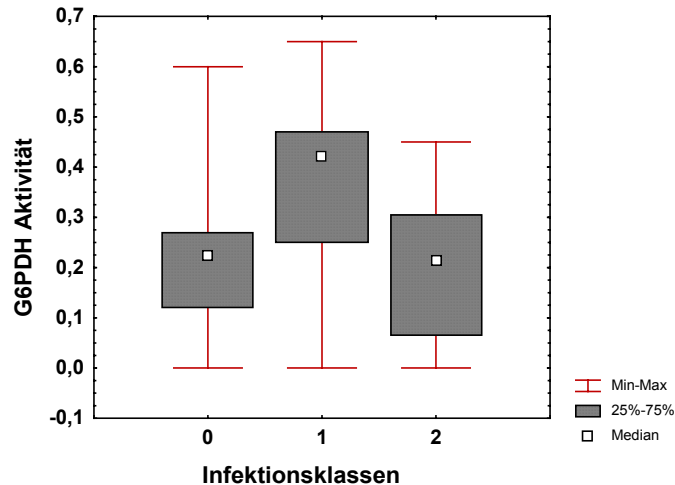


Abb. 6.32: Aktivität der G6PDH (Absorbtion) in Makrophagen Aggregaten von *Liza aurata* aus der hoch belasteten Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

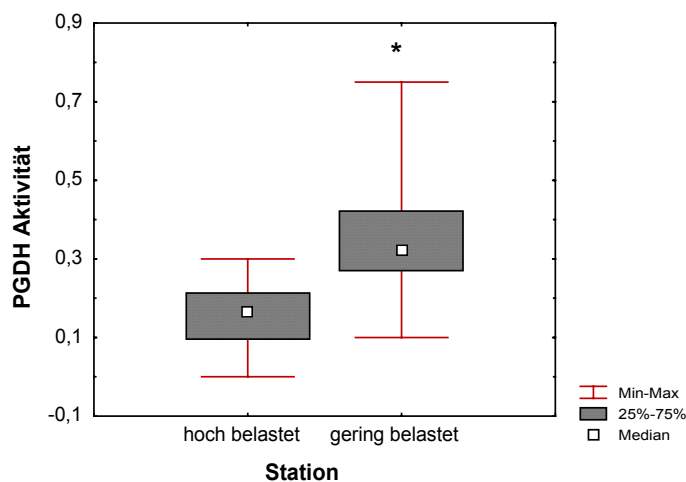


Abb. 6.33: Aktivität der PGDH (Absorbtion) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem gering belasteten Gebiet Maagan Michael und der hoch belasteten Bucht von Haifa. Die Unterschiede zwischen den Infektionsklassen sind statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p < 0,01$ ).

### Lysosomenstabilität

#### Gering belastete Fische

Die Lysosomenstabilität der ersten Lysosomenpopulation (Lys1) zeigte sich von der Infektion relativ unbeeindruckt, was sich darin äußerte, dass es bei Einsatz und fortschreitender Infektion insgesamt nur zu einer sehr geringen Abnahme der Lysosomenstabilität kam (Abb. 6.34).

Deutlicher war die Reaktion der zweiten Lysosomenpopulation (Lys2). Hier kam es bei Start der Infektion (Infektionsklasse 1) gegenüber den nicht infizierten Meeräschen zu einer signifikanten Abnahme der Lysosomenstabilität, die auch in der 2. Infektionsklasse unverändert niedrig blieb (Abb. 6.35).

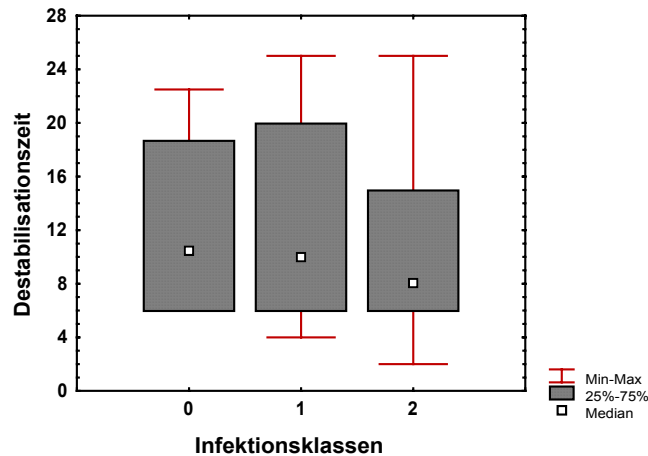


Abb. 6.34: Lysosomenstabilität (1. Peak) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem Referenzgebiet in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium, dargestellt in Minuten Destabilisationszeit. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

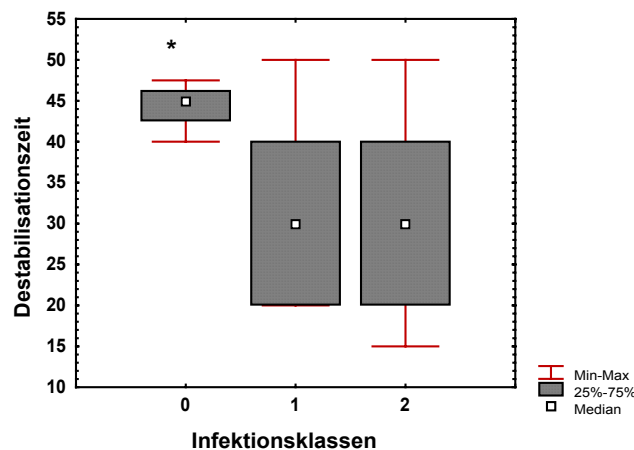


Abb. 6.35: Lysosomenstabilität (2. Peak) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem Referenzgebiet in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ ).

### Hoch belastete Fische

Bei den hoch belasteten Meeräschen wurde eine Abnahme der Lysosomenstabilität zwischen der Infektionsklasse 1 und der Infektionsklasse 2 festgestellt, diese Abnahme war allerdings nicht statistisch signifikant (Abb. 6.36). Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Individuen und solchen der ersten Infektionsklasse waren nur gering. Im Gegensatz zu den gering belasteten Fischen waren die Ergebnisse der ersten und der zweiten Lysosomenpopulation nahezu identisch. Es kam allerdings auch in der Gruppe der belasteten Fische zu einer stärkeren Abnahme der Membranstabilität bei der zweiten Lysosomenpopulation.

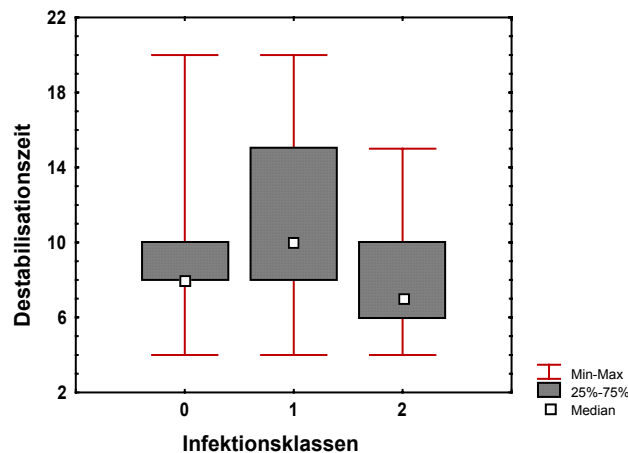


Abb. 6.36: Lysosomenstabilität (1. Peak) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus der belasteten Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium, dargestellt in Minuten Destabilisationszeit. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

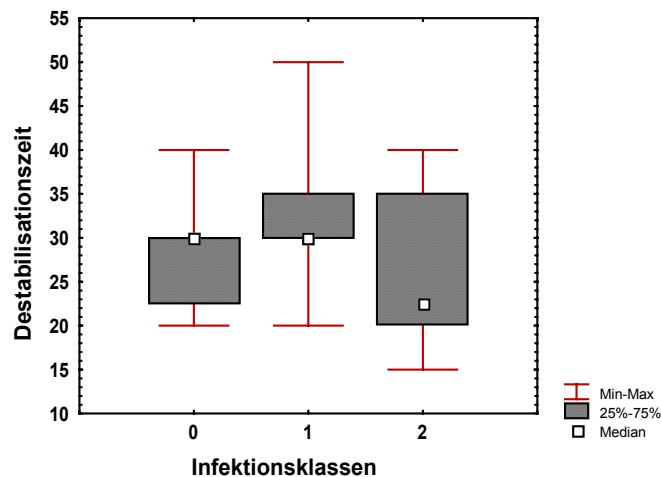


Abb. 6.37: Lysosomenstabilität (2. Peak) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus der belasteten Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium, dargestellt in Minuten Destabilisationszeit. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

## EROD

### Gering belastete Fische

In der Gruppe der gering belasteten Fische der Referenzstation gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede der EROD Aktivität zwischen den einzelnen Infektionsklassen und den nicht infizierten Meeräschen. In der Infektionsklasse 1 wurde allerdings eine höhere Aktivität als in den anderen beiden Klassen gemessen (Abb. 6.38).

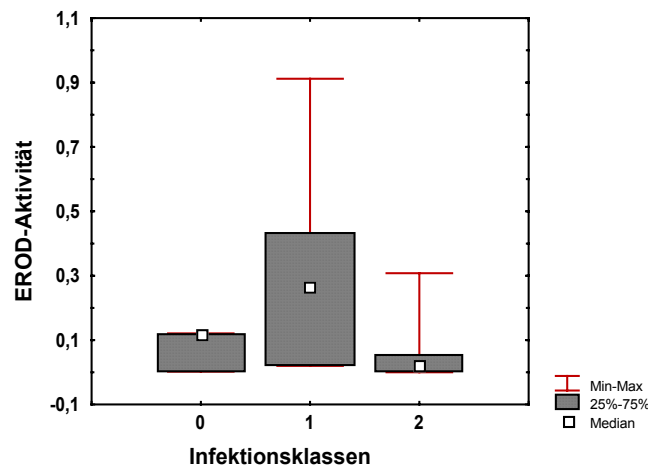


Abb. 6.38: EROD Aktivität (nmol Resorufin/mg Protein/min) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem Referenzgebiet in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

#### Hoch belastete Fische

Auch bei den hoch belasteten Fischen wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infektionsklassen festgestellt. Aber auch hier war deutlich, dass sich in der Infektionsklasse 1 auch hoch induzierte Fische befanden (Abb. 6.39).

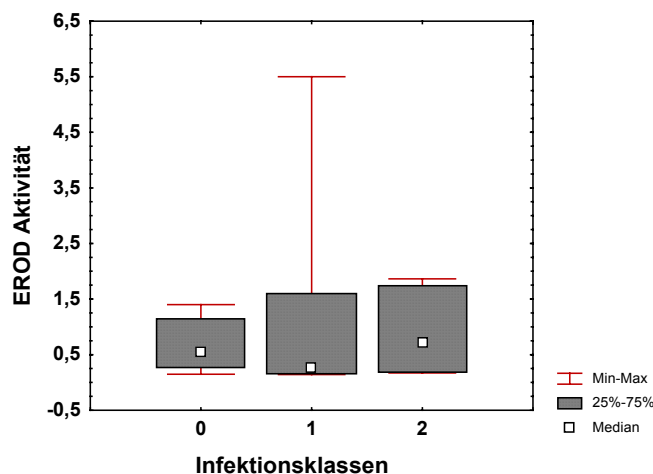


Abb. 6.39: EROD Aktivität (nmol Resorufin/ mg Protein/ min) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus der belasteten Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

### Konditionsfaktor und Lebersomatischer Index (LSI)

Sowohl in der Gruppe der belasteten, als auch in der Gruppe der gering belasteten Meeräschen blieben der Konditionsfaktor und der lebersomatische Index im Verlauf der Infektion nahezu identisch, veränderten sich also nicht.

Diese Parameter zeigten also keine Effekte in Bezug auf eine Protozoeninfektion, wohl aber in Bezug auf anthropogene Belastungssituationen (Siehe vorhergehendes Kapitel).

### Leberfarbe und Fettgehalt im Muskel

Gering belastete Fische

Die Leberfarbe gibt indirekt Auskunft über den Akkumulationsgrad von Neutrallipiden in der Leber glycogenspeichernder Fischarten (Broeg et al. 1999). Betrachtete man unter diesem Aspekt die Verteilung der Leberfarbe auf die unterschiedlichen Infektionsklassen, so fiel auf, dass in der gering belasteten Gruppe die Fische, die infiziert waren, einen höheren Fettgehalt in der Leber aufwiesen, als die nicht infizierten (Abb. 6.40). Auch was den Fettgehalt im Muskel betraf, biochemisch ermittelt als  $\mu\text{g}$  Fett pro kg Frischgewicht, so hatten die nicht infizierten Fische der gering belasteten Station einen niedrigeren Fettgehalt im Muskel, als die infizierten (6.41). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass diese Parasiten gut genährte Wirte bevorzugen.

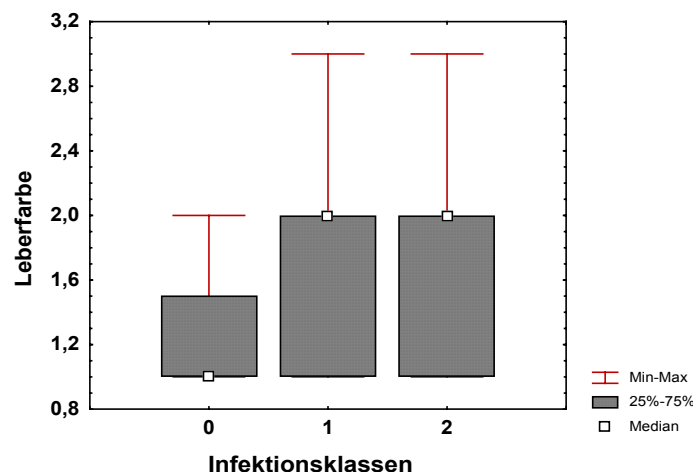


Abb. 6.40: Leberfarbe von *Liza aurata* aus dem Referenzgebiet in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).



Abb. 6.41: Fettgehalt im Muskel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) von *Liza aurata* aus dem Referenzgebiet in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Der Unterschied zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 ist statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ ).

#### Hoch belastete Fische

Bei den hoch belasteten Meeräschen hingegen hatten die nicht infizierten Fische den höheren Fettgehalt im Muskel, die Fische mit Infektionsklassen 1 und 2 wiesen geringere Fettgehalte auf. Diese Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant (Abb. 6.42).

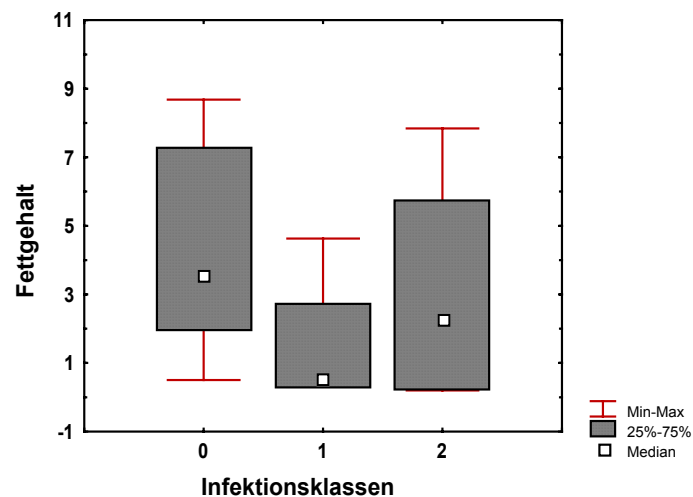


Abb. 6.42: Fettgehalt im Muskel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) von *Liza aurata* aus der hoch belasteten Bucht von Haifa in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch nicht signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ).

## Schadstoffe

Für die Schadstoffbelastung in den unterschiedlichen Infektionsklassen wurden alle Fische beider Stationen zusammengefasst, da nur so aufgrund einer ausreichenden Stichprobenzahl eine reelle statistische Auswertung möglich war.

Fische, die nicht infiziert waren, wiesen eine signifikant höhere Belastung mit den Schadstoffen p,p-DDE, p,p-DDD, PCB 101 und PCB 180 im Vergleich zu den infizierten Meeräschen beider Infektionsklassen auf (Abb. 6.43, A-C). Auch in Hinblick auf die anderen chlororganischen Schadstoffe waren die nicht infizierten Fische höher belastet, allerdings nicht statistisch signifikant.

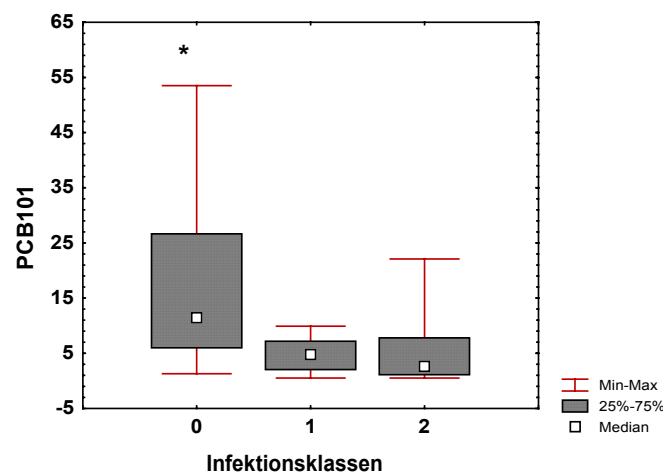


Abb. 6.43 A: Gehalt von PCB 101 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht) im Muskel von *Liza aurata* in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ , \*).

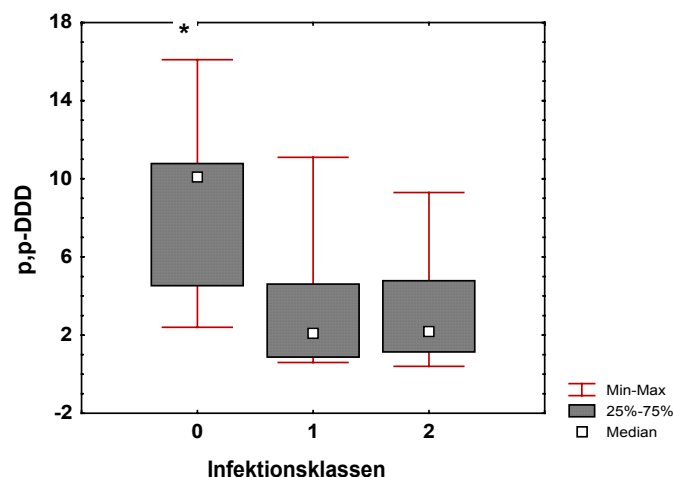


Abb. 6.43 B: Gehalt von p,p-DDD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht) im Muskel von *Liza aurata* in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ , \*).





Abb. 6.43 C: Gehalt von p,p-DDE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht) im Muskel von *Liza aurata* in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ ).

Bei den gering belasteten Fischen konnten keine Unterschiede in der Schadstoffbelastung mit chlororganischen Kohlenwasserstoffen zwischen den nicht infizierten und den infizierten Meeräschen festgestellt werden. Bei der Belastung mit Kupfer hingegen zeigten die nicht infizierten Fische eine niedrigere Konzentration dieses Metalles im Muskel, als die Fische in den Infektionsklassen 1 und 2 (Abb. 6.44).

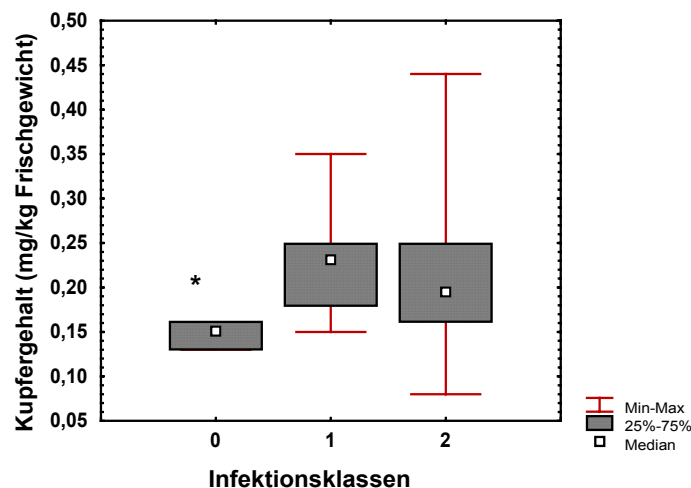


Abb. 6.44: Kupferkonzentration im Muskel von *Liza aurata* aus dem Referenzgebiet in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Der Unterschied zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 ist statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ ).

Entsprechende Ergebnisse wurden ermittelt für die folgenden Parameter:

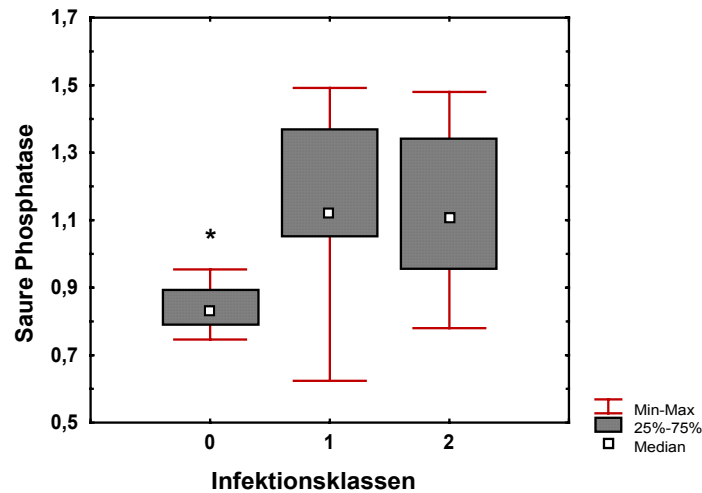


Abb. 6.45: Aktivität der Sauren Phosphatase (Absorbtion) in Makrophagen Aggregaten von *Liza aurata* aus dem Referenzgebiet in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ ).

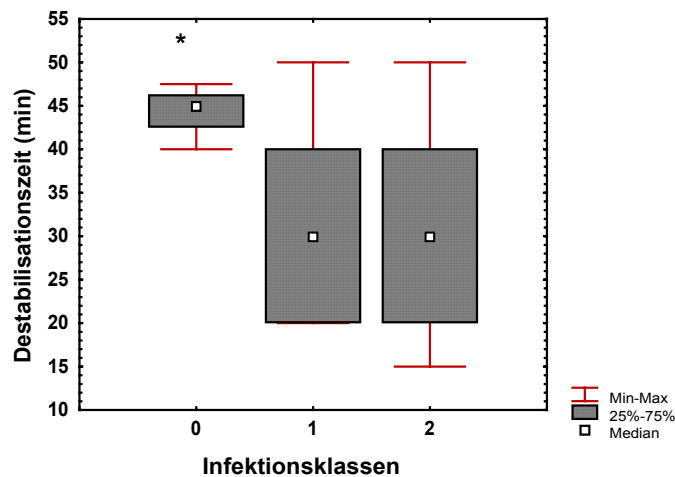


Abb. 6.46: Lysosomenstabilität (2. Peak) im Lebergewebe von *Liza aurata* aus dem Referenzgebiet in verschiedenen Infektionsklassen: 0= nicht infiziert, 1= Diffuse Infiltration, keine Zysten, 2= Zystenstadium. Die Unterschiede zwischen den nicht infizierten Fischen und Klasse 1 und 2 sind statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test,  $p < 0,05$ ).

### Schlussfolgerung

Die einzelnen untersuchten Parameter der Immunfunktionen, der Biomarkerantwort sowie generelle Körperindizes zeigten unterschiedliche Abhängigkeiten von der anthropogenen Belastungssituation (siehe auch Kapitel 4) und der Infektion mit einzelligen Parasiten.

In der folgenden Tabelle sind diese Beziehungen zusammenfassend dargestellt.

In der ersten Spalte finden sich die untersuchten Parameter, in der ersten Zeile die Abhängigkeiten von: chemischer Belastung, Infektion, und Wechselwirkungen. Ein **x** markiert eine signifikante Abhängigkeit ein **(x)** eine sichtbare Abhängigkeit, die nicht statistisch signifikant ist:

Tab. 6.1: *Liza aurata*: Abhängigkeiten der untersuchten Parameter in MA und Lebergewebe von chemischer Belastung, Infektion mit Myxosporidien, beziehungsweise von beidem. X= statistisch signifikante Abhängigkeit, (x)= Anhand der Daten erkennbare Zusammenhänge, die statistisch nicht signifikant waren ( $p > 0,05$ ).

	<b>Belastung</b>	<b>Infektion</b>	<b>Belastung und Infektion</b>
MA-SP			<b>x</b>
MA-Größe			<b>x</b>
MA-Anzahl	<b>x</b>	<b>(x)</b>	
MA-PGDH	<b>x</b>		
MA-G6PDH	<b>(x)</b>	<b>x</b>	
MA-iNOS			<b>x</b>
Lysosomenstabilität			<b>x</b>
EROD	<b>x</b>	<b>(x)</b>	
Leber-PGDH		<b>(x)</b>	
Leber-G6PDH	<b>x</b>	<b>(x)</b>	
Konditionsfaktor			<b>unsicher</b>
LSI	<b>x</b>		

Zusammenfassend konnte festgestellt werden:

Immunparameter können im Fall einer Infektion der Leber nicht als Indikator für Schadstoffeffekte herangezogen werden. Dies gilt für die Aktivität der Sauren Phosphatase und die Größe der Makrophagen Aggregate.

Eine Ausnahme bildet die Aktivität der PGDH in Makrophagen Aggregaten. Dieses Enzym zeigte sowohl in der gering, als auch in der hochbelasteten Gruppe keine Aktivitätsunterschiede im Verlauf der Infektion, wohl aber hochsignifikante Unterschiede zwischen den Belastungsgruppen mit höherer Aktivität in den gering belasteten Fischen. Auch die Biomarker, insbesondere die Lysosomenmembranstabilität wurde von der Aktivität des Immunsystems in infizierten Fischen beeinflusst. Dies zeigte sich in einer Herabsetzung der Membranstabilität in den Hepatozyten diesen Meeräschen, insbesondere in der Infektionsklasse 1.

Bei einer Leberinfektion kann dieser Parameter daher nicht zur Überwachung von Schadstoffeffekten eingesetzt werden. Einzig der lebersomatische Index veränderte sich nicht

während der Leberinfektion. Er war in allen Infektionsklassen in gering belasteten Fischen signifikant niedriger, als in den hoch belasteten Fischen.

Über diese Erkenntnisse hinaus konnten deutliche auch Zusammenhänge zwischen den untersuchten Immunfunktionen ermittelt werden:

*Spezielle Reaktion der G6PDH*

Während auf der unbelasteten Station eine Herabsetzung der G6PDH Aktivität in MA mit einsetzender Infektion gemessen werden konnte (vergleiche auch Kapitel 5, G6PDH-Aktivität in Plasmodien), ist dieses "Zellschutz-Enzym" (wegen Abbau des oxidativen Stress) in den Fischen der belasteten Station in den MA induziert. Es kam zu keiner Hemmung der Enzymaktivität, sondern im Gegenteil zu einer Aktivitätserhöhung mit einsetzender Infektion. Außerdem lag die Aktivität der G6PDH im Lebergewebe von belasteten Fischen erheblich höher, als in unbelasteten.

Tab. 6.2.: Korrelationen der Aktivität von Enzymen in MA der Leber von *Liza aurata*.  
 Markierte Korr. signifikant für  $p < .05000$   
 N=26 (Fallweiser Ausschluß von MD)

	<b>PGDH</b>	<b>G6PDH</b>	<b>iNOS</b>
<b>PGDH</b>	<b>1.00</b>	<b>-.39</b>	<b>.64</b>
<b>G6PDH</b>	<b>-.39</b>	<b>1.00</b>	<b>-.54</b>
<b>iNOS</b>	<b>.64</b>	<b>-.54</b>	<b>1.00</b>

Auf der nicht belasteten Station konnte ein Zusammenhang zwischen iNOS Aktivität, G6PDH- und PGDH Aktivität festgestellt werden. Während die iNOS positiv mit der PGDH korreliert war, wurde eine negative Korrelation mit der G6PDH ermittelt (Tab.6.2). Alle Korrelationen waren statistisch signifikant.

In den belasteten Fischen war dieser Zusammenhang nicht zu erkennen.

## Diskussion

Viele Chemikalien sind dafür bekannt, die unspezifische Immunantwort von Fischen zu modulieren. Dazu gehören Schwermetalle (zusammengefasst von Zelikoff 1993), Chlorbleiche (Aaltonen et al., 2000), Chlorothalonil (Baier-Anderson und Anderson 2000), PCBs und HCH (Sweet 1999), Heptachlor und Chlordan (Broeg et al., 2002, eingereicht). Die Effekte dieser Chemikalien auf das Immunsystem wurden in den meisten Fällen unter Einsatz von Einzelstoffen in kontrollierten Experimenten an isolierten Phagozyten untersucht. Über die tatsächlichen Auswirkungen von komplexen Mixturen, wie sie im Meer vorliegen, geben diese Experimente keine Auskunft.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Veränderungen der Makrophagenfunktionen in verschiedenen Fischarten aus unterschiedlich stark belasteten Gebieten und ihre Nutzung als Marker für Immunmodulation durch Schadstoff- und Parasiteneinfluss. Da die Leber im Zentrum von Schadstoffwirkungen steht und sich dort toxische Effekte bereits in einem sehr frühen Stadium der Schädigung manifestieren (Köhler 1991), konzentrierte sich diese Studie auf die Reaktionen des unspezifischen Immunsystems in der Leber von Fischen. Makrophagen wandern in die Leber und aggregieren dort zu Makrophagen Zentren als Folge von Infektionen (Ellis et al., 1976), Hunger (Agius und Roberts, 1981), Alter (Brown und George, 1985, Marty et al., 1999), Hitzestress (Blazer et al., 1987) und Schadstoffeinfluss (Kranz und Gercken 1987, Broeg et al., 1999, zusammengefasst von Bols et al., 2001) oder aber liegen als Einzelzellen in dichtem Kontakt zu den Endothelien und Gallengängen vor.

Viele Autoren stellten sich bereits die Frage, ob die Anzahl und Größe von Makrophagen Aggregaten Aussagekraft für Schadstoffeffekte haben können und sich diese Parameter für den Einsatz im Schadstoff-Effekt-Monitoring eignen. Die meisten Untersuchungen konzentrierten sich auf die Aggregate der Milz (Kranz und Gercken, 1987, Fournie et al., 2001). Es liegen aber auch Studien über MA-Veränderungen in der Leber unter Schadstoffeinfluss vor (Payne und Fancey, 1989, Haaparanta et al., 1996). Die histopathologischen Untersuchungen beschränkten sich darauf, die Anzahl von Makrophagen Aggregaten und/oder ihre Größe zu ermitteln, Funktionen der Aggregate wurden in der Regel nicht betrachtet.

Die vorliegende Arbeit ist ein erster Ansatz, die Modulation von Makrophagen Funktionen unter realen Schadstoffbelastungen in küstennahen Bereichen von Nordsee, Mittelmeer und Rotem Meer auf enzymatischer Ebene zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen deutliche, toxisch bedingte Veränderungen, sowohl innerhalb der Aggregate aus der Leber, als auch in isolierten Einzelzellen aus der Kopfniere.

Um enzymatische Endpunkte meßbar zu machen, waren in beiden Fällen, bei den Messungen *in situ* und *in vivo*, verschiedene Techniken nötig. Ein Einblick in die Reaktion von Makrophagen Aggregaten in der Leber war nur möglich durch die Messung der Enzymaktivitäten an histologischen Gefrierschnitten. Auf diesem Wege konnten Immunzellen innerhalb der Leber lokalisiert, und dann interaktiv die Enzymaktivität in den Makrophagenzentren gemessen werden. Eine Isolation von Makrophagen Aggregaten aus der Leber ist nicht möglich, da die Aggregate im Verlauf des Isolationsprozesses wie das gesamte Lebergewebe zerstört werden und nur Einzelzellen intakt bleiben.

Dies war im Fall der vorliegenden Arbeit aus verschiedenen Gründen nicht wünschenswert: Zum Einen sollte auch die Größe und die Anzahl der Aggregate berücksichtigt, und in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Zum Anderen war die Frage, ob eine Art Zonierung der Funktionen innerhalb der Aggregate festgestellt werden könnte. Ein weiterer Faktor war

die mögliche Freisetzung von hydrolytischen Enzymen aus den Aggregaten in das umliegende Lebergewebe, die nach der Einzelzellisolation nicht mehr hätte überprüft werden können.

Für die Untersuchung von Enzymaktivitäten innerhalb von intakten Geweben bieten sich histochemische Nachweise an Gefrierschnitten an. Durch die Tatsache, daß auf eine chemische Fixierung und auf Entwässerungsreihen für Einbettungsmedien verzichtet werden kann, bleiben die Enzyme in situ weitgehend intakt. Außerdem ist die genaue Lokalisierung der Enzymaktivität im Schnitt möglich, was für die Messung in Makrophagenzentren eine Grundvoraussetzung war. Bei ähnlichen Fragestellungen, wie zum Beispiel der Erkennung früher, preneoplastischer Stadien in der Leber von Flundern und im Verdauungsapparat der Ratte anhand von Enzymaktivitätsänderungen, wurde ebenfalls auf diese histochemische Technik zurückgegriffen (Van Noorden et al., 1997, Köhler und Van Noorden 1998, Van Noorden und Jonges 1995, Chieco et al., 1988).

### **Untersuchungen an isolierten Makrophagen der Kopfniere**

Um festzustellen, welche Enzyme im Verlauf der Aktivierung von Makrophagen, sowie unter Belastungssituationen Aktivitätsänderungen zeigen, wurden Untersuchungen an isolierten Makrophagen der Kopfniere von Flundern durchgeführt. Stimulierung mit dem löslichen Aktivator PMA führten dabei zu folgenden Ergebnissen:

Während die Enzyme G6PDH, PGDH und ALDH, sowie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite durch den „respiratory burst“ durch die Stimulierung induziert wurden, zeigten die Saure Phosphatase und die iNOS keine Aktivitätsveränderung nach Stimulation.

Lösliche Stimulatoren wie PMA agieren als Diacylglycerol (DAG) -Simulator und umgehen daher einen großen Teil der rezeptorgesteuerten Signaltransduktion. Im Gegensatz dazu interagieren partikuläre Substanzen wie zum Beispiel Zymosan mit einem Rezeptor auf der Zelloberfläche, gefolgt von Veränderungen des Zytoskeletts im Makrophagen und der Aktivierung von Signaltransduktionswegen. Wird der Partikel phagozytiert, verbindet sich der NADPH-Oxidase Komplex, der aus einem membrangebundenen Heterodimer, zwei cytosolischen Komponenten und assoziiertem GTP-Bindungsprotein besteht (Dagher et al, 1995, Quinn 1995). Die Signalwege, die das Verbindungsglied zwischen Rezeptor/Ligand-Komplex und ROS-Produktion bilden, werden zur Zeit an Säugetiermakrophagen untersucht (Krause et al., 1997). Sie beinhalten die Aktivierung der Phospholipasen A2, C und D. Als Folge dieser Aktivierung werden Fettsäuren als second messenger freigesetzt, unter anderem Arachidonsäure, Inositol Triphosphat (IP3), Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidsäure (McPhail et al., 1993). Inositol Triphosphat ist verantwortlich für die geregelte Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern (Krause et al., 1997) und DAG ist ein Aktivator der Protein Kinase C (PKC) (Heyworth und Badwey, 1990). Die Aktivierung der PKC führt zur Phosphorylierung der Serin- Enden der p47phox, einer der cytosolischen Komponenten der NADPH-Oxidase. Diese assoziiert daraufhin and der Zellmembran mit den anderen Komponenten des NADPH-Oxidase Komplexes (Curnutte et al., 1994).

PMA ist aus diesen Gründen ein spezieller Stimulator des NADPH-Oxidase Komplexes, zu dessen Funktionsfähigkeit auch die Induktion des NADPH liefernden Stoffwechselweges gehört. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, werden durch PMA direkt oder über den gestiegenen Bedarf an NADPH ebenfalls die Enzyme des Pentosephosphatweges aktiviert. Die Aktivierung der G6PDH in Fischen kann im Verlauf der Signaltransduktion auch durch die Erhöhung des intrazellulären Calziumspiegels unterstützt werden (Shimeno 1972). Aber auch das Enzym ALDH, wichtig für die Entgiftung von Aldehyden, die durch Radikalreaktionen gebildet werden, erfährt durch die PMA-Stimulierung eine

Aktivitätssteigerung. Es ist also tatsächlich ein ganzer Komplex von Enzymsystemen über diesen Weg der Proteinkinase C zu aktivieren.

Andere Fettsäuren des Signalweges, wie Arachidonsäure sind auch in der Lage, die G6PDH als lipogenes Enzym zu hemmen (Kletzin et al., 1994). Eine Hemmung konnte in der vorliegenden Arbeit durch Einfluss von PMA nicht festgestellt werden, anders als in Studien von Costa-Rosa et al. (1995), die unter dem Einfluss von Adrenalin in PMA stimulierten Macrophagen eine Herabsetzung der G6PDH Aktivität nachwiesen. Die durch Adrenalin induzierte Hemmung der G6PDH erfolgte hierbei durch die Aktivierung der cAMP abhängigen Protein Kinase (PKA).

Die iNOS in Makrophagen der Kopfniere wurde nach Stimulierung mit PMA in der vorliegenden Studie nicht induziert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung dieses Enzyms nicht über den selben Signalweg wie die Aktivierung des „respiratory burst“ verläuft, was auch sinnvoll ist, wenn man berücksichtigt, dass eine parallele, gleichzeitige Erzeugung beider Radikale (ROI, NOI) zur Bildung von Peroxynitrit führen kann, welches für den Organismus extrem schädigend wirkt.

Peroxynitrit wird in Säugetieren auch verantwortlich gemacht für eine Reihe nicht infektiöser Krankheitserscheinungen wie cerebrale Ischaemia (Forman et al., 1998), dem akuten Herzinfarkt (Shimojo et al., 1999) und Herzschaden (Wang und Zweier, 1996). Außerdem verursacht endogen erzeugtes Peroxynitrit Proteinoxidationen in den Mitochondrien und im Kern von immunstimulierten Makrophagen (Szabo et al., 1997). Aus diesem Grund ist nicht klar, ob Peroxynitrit für den Wirt nützlich ist, obwohl es in der Lage ist, die Entwicklung von Mikroben zu inhibieren. Unterstützt werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch durch die Untersuchungen von Campos-Perez et al. (2000), die keine signifikante Hemmung der Fischerreger *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmonarium* und *Yersinia ruckeri* durch Peroxynitrit im zellfreien Medium feststellen konnten, wohingegen NO alleine das Wachstum dieser Erreger signifikant hemmte. Eine nicht parallele Freisetzung von NO und  $O_2^-$ , wobei ein unterschiedlicher Transduktionsweg unabdinglich ist, ist also durchaus im Interesse des Wirtes (Ratnam und Mookerjea, 1998).

In Säugetiermakrophagen wird NO als Antwort auf Cytokine, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder Parasiten durch die Aktivität der iNOS produziert (Nathan 1992). LPS kann membrangebundene Signalwege aktivieren (Arachidonsäure), oder Transduktionssignale für die Genexpression von Cytokinen über den LPS-Rezeptor liefern (Aderem et al., 1988, Chen et al., 1992 in Cross et al., 1999).

Die NO Produktion ist durch eine ganze Reihe von Substanzen auf der transkriptionellen und posttranskriptionellen Ebene reguliert (Nathan und Xie, 1994). Da die Homologie zwischen den sequenzierten Abschnitten der Gen-Promoter bei verschiedenen Arten nicht sehr groß ist, muss davon ausgegangen werden, dass es starke Unterschiede bei der iNOS Regulation zwischen den Arten gibt (Tafalla und Novoa, 2000).

In Fischen wurde die NO Produktion in Makrophagen, induziert durch LPS, in Goldfischen (*Carassius auratus*), Katzenwelsen (*Clarias gariepinus*) und Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) demonstriert (Neumann et al., 1995, Yin et al., 1997, Tafalla und Novoa, 2000). In *Sparus aurata* konnte die Produktion von NO nicht durch LPS alleine induziert werden, sondern erst in Kombination mit Makrophagen aktivierendem Faktor (MAF) (Mulero und Meseguer, 1998). Von iNOS Induzierung durch PMA liegen in Fischmakrophagen bislang keine Informationen in der Literatur vor.

Dies ist die erste Studie, die iNOS Aktivität in PMA stimulierten Makrophagen von Fischen untersucht. Wie in der vorliegenden Arbeit konnte auch in mit PMA stimulierten humanen Makrophagen keine Aktivitätserhöhung der iNOS während des „respiratory burst“ festgestellt

werden (Li et al. 2000). Dies ist ein Hinweis darauf, dass es hinsichtlich der Aktivierbarkeit dieses Enzyms Ähnlichkeiten zwischen Fischen und Säugetieren gibt.

Während die oben genannten Enzymsysteme etwas mit der Freisetzung von reaktiven Metaboliten zur Abtötung von Pathogenen zu tun haben, steigert sich die Saure Phosphatase (SP) Aktivität erst im Fall einer vollzogenen Phagozytose, um die aufgenommenen Erreger abzubauen. Die SP wird daher von PMA nicht induziert. Zu einer Aktivitätssteigerung kommt es erst im Anschluss an phagozytotische Vorgänge, wenn hydrolytische Enzyme für die Verdauung bereitgestellt werden müssen. Ein ähnliches Phänomen ist auch bekannt von Zellen der Mitteldarmdrüse von Crustaceen. Dort kommt es erst bei Nahrungsaufnahme zu einer Aktivitätssteigerung lysosomaler Enzyme (Köhler et al., 1998).

In humanen Makrophagen ist die Induzierung der SP-Aktivität ein Marker für die Aktivierung von Makrophagen (Klein, 1991). Untersuchungen von Enane et al. (1993) an Peritonealmakrophagen der Regenbogenforelle erbrachten keinen signifikanten Unterschied der SP Aktivität zwischen nicht aktivierten Makrophagen und Makrophagen, die mit Formalin-abgetöteten *Aeromonas salmonicida* stimuliert worden waren. Die Fische wurden allerdings erst 7 Tage nach der Stimulation getötet. Untersuchungen in unserem Labor in der Leber von Steinbutt zeigten, dass die durch Schadstoffeinfluss gesteigerte Aktivität der SP in MA bereits eine Woche danach wieder auf ein niedrigeres Niveau abgefallen war (Broeg et al., eingereicht).

Unabhängig von der Tatsache, dass die SP in Makrophagen aus der Kopfniere der Flunder in der vorliegenden Arbeit nicht durch PMA induziert wurde, konnte eine signifikant niedrigere Grundaktivität in Flundern beiderlei Geschlechtes auf der belasteten Station festgestellt werden. Die möglichen Ursachen für die schadstoffinduzierte Hemmung der SP werden in einem späteren Abschnitt zusammen mit den Ergebnissen der Freilanduntersuchungen an Leber MA-SP diskutiert.

Im belasteten Elbeästuar wurden unter den isolierten Kopfnierzellen bereits aktivierte Makrophagen/Monozyten gefunden, ohne dass eine Stimulierung mit PMA nötig war. Diese Zellen zeigten eine erhöhte G6PDH und PGDH Aktivität. Auch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen war in mehr Immunzellen ohne vorherige PMA Stimulierung zu beobachten, als auf der geringer belasteten Station. Parallel dazu war in den Flundern der belasteten Station die Aktivität der CYP1A1 EROD in Hepatozyten signifikant höher, als in Fischen von der gering belasteten Station. Ein Grund für die „Voraktivierung“, oder unangemessene Aktivierung könnte die Stimulierung der Makrophagen durch metabolisch erzeugte Retinoidsäure sein.

Fische metabolisieren Retinoidsäure in einem Hydroxylationsschritt, der durch den Einfluss von coplanaren polychlorierten Biphenylen (PCB), die Cytochrom P4501 induzieren, beschleunigt werden kann. Retinoidsäure hat eine ausgesprochen hohe biologische Aktivität. Ein erhöhter Metabolismus dieser Substanz könnte daher für bestimmte Effekte von PCBs in Fischen verantwortlich sein (Gilbert et al., 1995, Broeg et al., 2002, eingereicht).

In der vorliegenden Studie zeigten die Zellsuspensionen von Makrophagen, die bereits in nicht-stimuliertem Zustand signifikant höhere G6PDH-Aktivität als die Kontrollen vorwiesen, eine geringere Aktivitätssteigerung nach Stimulation mit PMA. Die G6PDH Endpunkt-Aktivität dieser Zellen war also herabgesetzt. Diese Beobachtungen deuten auf eine Kombination von Vorstimulierung und Endpunkthemmung hin, entweder bedingt durch die Effekte der komplexen Mischung verschiedener Kontaminanten, oder durch eine zusätzliche chronische Schädigung der Monozyten durch Schadstoffe. In Expositionsexperimenten am Steinbutt, die in unserem Labor durchgeführt wurden, zeigte sich eine Aktivierung von Makrophagen in der Leber nach Induktion der CYP1A1 durch den Modellinduktor  $\beta$ -NF. Bei zusätzlicher Injektion von Organochlorverbindungen war die Makrophagenaktivität



herabgesetzt und die Aktivierung der Phagozyten verlangsamt. Parallel dazu wurde eine höhere Lipidperoxidation und Zellschädigung ermittelt (Broeg et al., eingereicht).

PCBs verursachen eine Herabsetzung des Vitamin A- Spiegels in der Leber in nahezu allen Vertebratenklassen, einschließlich Fischen (Villeneuve et al., 1971, Mercier et al., 1990, Spear et al., 1986, Palace und Brown, 1994). Die Leber fungiert als Speicher für dieses Vitamin, das vor Allem für die Reproduktion, das Wachstum und die endotheliale Differenzierung essentiell ist (Thompson, 1976), aber auch als Radikalfänger einen Schutz vor oxidativem Stress bietet.

Eine weitere mögliche Erklärung der Voraktivierung bei gleichzeitiger Herabsetzung der Endaktivität- das heißt Suppression der Freisetzung von ROS und der G6PDH-Aktivität-kann in der toxischen Wirkung von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) und coplanaren PCBs liegen, die im Bereich der Elbemündung in relativ hohen Konzentrationen vorliegen (Arge Elbe 1999). Diese Substanzen stehen im Verdacht, ihre Toxizität über die dauerhafte Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zu manifestieren.

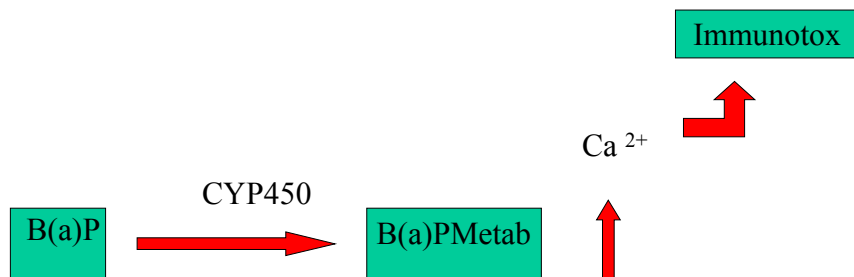


Abb. 9: Immunotoxizität von Benz(a)pyren (B(a)P)  
nach Munho et al., 1997

Munho et al. (1997) entwickelten eine Hypothese des möglichen Zusammenhanges zwischen PAK-Immunotoxizität, Aktivität des CYP450-Systems und der dauerhaften Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels in periferen Monozyten des Menschen (Abb. 9). In menschlichen T-Zellen wurde eine Beziehung zwischen der Immunotoxizität von PAKs und ihrer Fähigkeit, die dauerhaft erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Konzentration aufrecht zu erhalten, nachgewiesen (Krieger et al., 1994). Spezielle Metabolite von B(a)P waren effektiver in der Erhöhung des  $Ca^{2+}$ -Spiegels, als B(a)P selber. Auf dem Signalweg der Phagozyten Aktivierung spielt die gezielte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  eine Schlüsselrolle und jede Intervention in diesem Signalweg kann daher den Aktivierungsprozess modulieren.

Deutlich wurden bei der Untersuchung von Makrophagenfunktionen an isolierten Zellen der Kopfniere von Flundern aus der Deutschen Bucht neben belastungsbedingten Unterschieden auch geschlechtsspezifische Unterschiede. Die SP Aktivität war niedriger in weiblichen Flundern aus dem belasteten Elbästuar, als in ihren männlichen Artgenossen. Die G6PDH-Aktivität und die ROS-Produktion waren in unstimulierten Makrophagen weiblicher Flundern

signifikant höher. Die „Voraktivierung“ war also in weiblichen Fischen ausgeprägter, als in männlichen. Untersuchungen über geschlechtsspezifische Unterschiede in der Reaktion des unspezifischen Immunsystems liegen für Fische nach unserem Wissenstand nicht vor. Aus Studien an Säugetieren ist jedoch bekannt, dass weibliche Sexualhormone wie Estradiol in der Lage sind, die Freisetzung von ROS zu regulieren (Chao et al., 1994). Untersuchungen an Menschen und Tieren zeigten, dass weibliche Individuen eine stärkere nicht-spezifische Immunabwehr haben, als männliche. So sind zum Beispiel Cytokine wie IL-1 durch Sexualhormone beeinflusst (Cannon und Pierre, 1997). Außerdem erhöht Östrogen in der Leber die Aktivierbarkeit von Kupfferzellen durch Lipopolysaccharide (LPS). Die Freisetzung von TNF-alpha und NO ist in östrogenbehandelten Kupfferzellen doppelt so hoch, wie in mit LPS stimulierten Zellen ohne Östrogen (Ikejima et al., 1998). Weibliche Säuger sind widerstandsfähiger gegen Krankheitserreger, haben aber auch häufiger mit Autoimmunerkrankungen zu kämpfen als männliche Individuen (Cannon und Pierre 1997). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren das erste Mal, dass die geschlechtsspezifischen Unterschiede nicht nur in höheren Vertebraten, sondern auch in Fischen vorliegen. Östrogene Effekte, wie sie durch Schadstoffe wie Nonylphenol verursacht werden, sollten aus diesem Grunde auch auf ihre potentielle Wirkung auf das Immunsystem mariner Vertebraten hin überprüft werden.

Die obigen Beobachtungen erklären allerdings nicht die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit nur in weiblichen Flundern der belasteten Station eine erhöhte M $\phi$  Aktivität ohne vorherige Stimulierung festgestellt wurde. Neben der Wirkung der Sexualhormone muss daher auch eine zusätzliche Schadstoffwirkung oder eine bakterielle Belastung in der Elbmündung in Betracht gezogen werden. Diese kann allerdings auch nicht der alleinige Grund für die „Voraktivierung“ sein, da ansonsten auch die männlichen Flundern davon hätten betroffen sein müssen. Dies war aber im vorliegenden Fall nicht zu erkennen.

Während die Gründe dieser Aktivität von Makrophagen aus der Kopfniere weiblicher Flundern ohne vorherige Stimulierung spekulativ sind, ist die Frage nach den Folgen für die Fische relativ klar. Da es sich um eine unangemessene Aktivierung handelt, bei der keine Pathogene getötet werden müssen, verbleiben dem Wirt nur die durch ROS Produktion verursachten Schäden an den eigenen Geweben. Schädigungen von Geweben durch die Freisetzung von reaktiven Metaboliten durch Makrophagen sind ausführlich untersucht und werden in einem späteren Abschnitt, wenn es um die Folgen von Parasiteninfektionen der Leber geht, diskutiert.

Zahlreiche Untersuchungen an Fischen im Freiland, sowie im Experiment demonstrierten eine erhöhte Häufigkeit von Tumoren in den Lebern weiblicher Flundern (Köhler et al., 2002, Köhler et al., eingereicht, Landwüst et al., 1996, Teh und Hinton, 1998). Intensive Studien an isolierten Hepatozyten befassten sich mit der Frage, ob oxidativer Stress in weiblichen Fischen ausgeprägter ist, als in männlichen und somit zum Teil verantwortlich zu machen ist für diese geschlechtsspezifischen Unterschiede (Winzer et al., 2001). Tatsächlich wurden für nahezu alle untersuchten radikalabfangenden Systeme höhere Aktivitäten in den Zellen männlicher Fische ermittelt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die eine belastungsbedingte Aktivität und Freisetzung von ROS durch Makrophagen weiblicher Flundern nachweist, geben weitere entscheidende Hinweise für die Aufklärung der Hintergründe der hohen Tumorfrequenz in weiblichen Flundern.

Folgende Schlüsse können aus den Untersuchungen an isolierten Makrophagen der Kopfniere für die weiteren Studien zur Nutzung von Makrophagenfunktionen im Schadstoff-Effekt-Monitoring gezogen werden:

Sowohl die Aktivität der Sauren Phosphatase, als auch die Aktivität der PGDH zeigten im nicht-stimulierten Zustand der Makrophagen belastungsbedingte Unterschiede. Diese beiden

Parameter können also auch *in situ* an gefrorenen Gewebeschnitten getestet werden, ohne dass eine vorherige künstliche Stimulierung nötig ist. Für Untersuchungen an der Flunder wurde die Aktivität der Sauren Phosphatase gewählt. Die PGDH-Aktivität war bei dieser Art im Lebergewebe so hoch, dass eine eindeutige morphologische Unterscheidung zwischen Makrophagen Aggregaten und Lebergewebe nicht möglich war. Im Fall von Meeräschen und Kaninchenfischen war dies dank der, verglichen mit der hohen Aktivität in MA relativ niedrigen PGDH-Aktivität im Lebergewebe möglich und wurde daher auch durchgeführt.

### **Saure Phosphatase Aktivität und Größe von Makrophagen Aggregaten der Leber- Natürliche Variabilität**

Um die Unterschiede der MA-SP Aktivität in Flundern und Meeräschen aus verschiedenen hoch belasteten Gebieten der Nordsee und des Mittelmeeres interpretieren und bewerten zu können, mussten Informationen über die natürliche Variabilität dieses Parameters erhoben werden.

#### *Salinität*

Als Grundlage für die Nutzung der MA-SP als Biomarker in Flundern der Deutschen Bucht wurde untersucht, ob die unterschiedliche Salinität der verschiedenen Probenahmestandorte einen Einfluss auf die MA-SP Aktivität haben würde. Innerhalb des Untersuchungszeitraumes von einem Monat zeigte sich dabei im Experiment keine Herabsetzung der MA-SP Aktivität in Flundern, die von 36‰ in 15‰ umgesetzt wurden, gegenüber den Fischen, die weiter bei 36‰ gehältert wurden. Ganz im Gegenteil war die MA-SP am dritten Tag nach der Umstellung in 15‰ in den umgesetzten Flundern signifikant erhöht. Von einer salinitätsbedingten Suppression der MA-SP in Mündungsbereichen mit niedriger Salinität kann also bei Freilanduntersuchungen nicht ausgegangen werden. Untersuchungen von anderen Autoren (Narnaware et al., 2000) an *Mylio macrocephalus* zeigten ebenfalls keine Unterschiede in der Phagozytoseaktivität von Makrophagen bei wechselnden Salinitäten.

#### *Temperatur*

Saisonale Unterschiede in der MA-SP Aktivität mit höchsten Aktivitäten im Sommer und im frühen Herbst und niedrigsten Aktivitäten im Winter und im Frühling deuteten auf einen starken Einfluss der Temperatur auf die Funktion der nicht-spezifischen Immunantwort in der Leber dieser wechselwarmen Vertebraten hin. Auch in den Mugiliden aus dem Mittelmeer zeigten sich Unterschiede zwischen den Herbst und Frühjahrsaktivitäten. Aus diesen Gründen kann ein direkter Vergleich zwischen verschiedenen Ergebnissen nur innerhalb einer Saison gezogen werden.

In der Nordsee fiel eine direkte Abhängigkeit der MA-SP von den vorliegenden Wassertemperaturen auf. Trägt man die MA-SP gegen die Temperatur auf, so zeigt sich eine sigmoide Funktion. Die vorherrschende Temperatur scheint also für die Aktivität der SP eine bestimmende Rolle zu spielen. Immunsuppression der humoralen und zellulären Immunantwort von Fischen wurde bereits in verschiedenen Arten beobachtet (Zapata et al., 1992, Bly und Clem, 1991, 1992) und wird als Grund für zahlreiche Krankheitserscheinungen diskutiert, die während des Winters in Kälte- und Wärme adaptierten Fischen auftreten (zusammengefasst in Tort et al., 1998, Crespo et al., 1994, Hayman et al., 1992, Bly und Clem, 1991). In der Regenbogenforelle ist die Produktion von Makrophagen aktivierendem Faktor (MAF) durch Leukozyten bei niedrigen Temperaturen herabgesetzt (Hardie et al., 1994). Arbeiten an Katzenwelsen zeigten, dass die Phagozytose von Kopfnierenzellen nicht durch niedrige Temperaturen beeinflusst wird, wohl aber die Freisetzung von ROS durch den „respiratory burst“ (Chen und Ainsworth, 1991).

Unseres Wissens nach ist dies die erste Arbeit, die eine Herabsetzung der digestiven Aktivität von Makrophagen wildlebender Fische bei niedrigen Temperaturen demonstriert. Frühere

Experimente in unserem Labor wiesen eine hochsignifikante Korrelation zwischen der MA-SP Aktivität und dem „respiratory burst“ in der Leber von Steinbutt nach (Broeg et al., eingereicht), so dass auch im vorliegenden Fall davon ausgegangen werden kann, dass neben der Aktivität der SP auch die Erzeugung von ROS saisonal herabgesetzt sein könnte. In wechselwarmen Organismen spielt bei kalten Temperaturen die angeborene Immunabwehr eine extrem wichtige Rolle bei Abwehr von Krankheitserregern, da spezifische Immunreaktionen, wie zum Beispiel die Erzeugung von Antikörpern sehr Temperatur empfindlich sind (Ellis, 2001). Schon bei optimalen Temperaturen dauert die Produktion von Antikörpern zwischen 15 Tagen und 6 Wochen. Die Funktionen von Lymphozyten sind bei niedrigen Temperaturen extrem herabgesetzt. Ist nun auch die unspezifische Immunantwort durch Kälte inhibiert, wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert, kann dies für die Flunderpopulationen ein zusätzliches Gesundheitsrisiko im Winter bedeuten.

Trotz der saisonalen Unterschiede in der MA-SP Aktivität wurde sowohl in Flundern, als auch in Meeräschen in allen Kampagnen mit Ausnahme der Probennahme im September 1995 die niedrigsten MA-SP Aktivitäten in den Fischen von den am höchsten belasteten Stationen (Elbe/Haifa) gemessen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Untersuchungen der Effekte durch Abwässer der Papierindustrie auf Plaque bildende Zellen des Immunsystems von *Channa punctatus* erzielt (Fatima et al., 2001): Eine temperaturabhängige Suppression, aber in jedem Fall war der Schadstoffeffekt ausgeprägter, als der Temperatureffekt.

In der vorliegenden Arbeit waren die Unterschiede zwischen den MA-SP Aktivitäten verschiedener Stationen deutlicher im Sommer und Frühherbst, wenn generell höhere MA-SP-Aktivitäten gemessen wurden. Im Winter war die MA-SP Aktivität auf allen Stationen niedrig und während im Sommer in Fischen aus Eider und Tiefer Rinne die Aktivität stieg, verblieb sie in Flundern aus der Elbe auf diesem niedrigen Niveau. Die Steigerung der MA-SP, die in Flundern der gering belasteten Stationen zu vermerken war, fand also in Fischen der Elbemündung nicht statt. Dies kommt einem erhöhten Krankheitsrisiko dieser Flundern gleich.

#### *Geschlechtsspezifische Variabilität*

In Flundern und in Meeräschen wurde eine höhere MA-SP Aktivität in weiblichen als in männlichen Fischen gemessen. Erste Hinweise für eine unterschiedliche Aktivität der Immunantwort in Männchen und Weibchen kamen von Morthy und Sweet (1938, in Pflugfelder, 1977). Sie fanden eine erhöhte Prävalenz von Helminthen in männlichen Hunden, verglichen mit den weiblichen Artgenossen. Hähne waren 19 mal höher mit Ascariden infiziert, als Hühner. Gerade an der Abwehr von Parasiten ist die nicht-spezifische Immunabwehr maßgeblich beteiligt (Cohen und Warren, 1982, Secombes und Chappel, 1996). Wie schon im ersten Abschnitt diskutiert, kann die stimulierende Wirkung weiblicher Sexualhormone auf Cytokinproduktion und Phagozytenaktivierung ein Grund für die deutlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede sein, die sich nicht nur in der Aktivität des „respiratory burst“ zeigen, sondern, wie mit dieser Studie gezeigt, auch in der unterschiedlichen digestiven Kapazität. Die Aktivität der Sauren Phosphatase ist hierbei von entscheidender Bedeutung und gilt als ein Marker für die Fähigkeit von Makrophagen, aufgenommene Bakterien und Parasiten auch abzubauen, so dass es zu keinem Wachstum und zu keiner Fortpflanzung im Wirt kommen kann (Attwood et al., 1996). Verschiedene Studien zeigten eine direkte Korrelation zwischen der Ansteckungsfähigkeit (Virulenz) von Bakterien und der Suppression der Aktivität der Sauren Phosphatase (Black et al., 1983).

Aber nicht nur zwischen männlichen und weiblichen Fischen wurden Unterschiede in der MA-SP Aktivität nachgewiesen. Während die Unterschiede zwischen den jeweiligen MA-SP Mittelwerten von Männchen und Weibchen relativ gering, aber dennoch statistisch signifikant waren, zeigten juvenile Flundern nahezu doppelt so hohe MA-SP Aktivitäten bei einer halb so

großen Größe der Makrophagen Aggregate. Die Abhängigkeit der Makrophagen Aggregate vom Alter der Fische wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (Agius 1981, Brown und George, 1985, Blazer et al., 1987, Pulsford et al., 1992).

Das Immunsystem junger Fische kann zudem noch nicht auf das volle Potential der erworbenen Immunität zurückgreifen, so dass die nicht-spezifische Immunität bei ihnen eine wichtigere Rolle spielt, als bei ihren adulten Artgenossen (Tatner und Manning, 1985, Fletcher 1982). Für die Anwendung dieser Parameter im Schadstoff-Effekt-Monitoring bedeutet diese Tatsache, dass Fische nur in eng gefassten Größenklassen untersucht werden können, um den Einfluß des Alters auf MA-SP und MA-Größe in der Leber der Fische so gering wie möglich zu halten.

Während der Reproduktionsphase wurde in weiblichen Flundern eine herabgesetzte MA-SP Aktivität in der Leber festgestellt. Veränderungen der humoralen und der zellulären Immunabwehr bei der Fortpflanzung wurden ebenfalls von Alcorn et al. (2002) in Lachsen (*Onchorhynchus nerka*) beschrieben. Komplement Aktivität und Lymphozytenzahlen waren dramatisch herabgesetzt. Diese Ergebnisse deuten auf ein potentiell Gesundheitsrisiko für weibliche Fische während der Reproduktionszeit hin. Die Tatsache, dass die Reproduktionszeit für Flundern in der Deutschen Bucht im Winter liegt und bei niedrigen Temperaturen die Immunantwort ohnehin supprimiert ist, kann dieses Risiko zusätzlich verschärfen.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Reproduktionszeit die sensitivste Periode für weibliche Flundern darstellt, die zusätzlich durch Schadstoffeinfluss belastet sind. In der vorliegenden Studie zeigten Flundern aus dem Elbeästuar in den Winter- und Frühlingsprobennahmen eine extrem herabgesetzte MA-SP Aktivität.

## **Saure Phosphatase Aktivität und Größe von Makrophagen Aggregaten der Leber-Schadstoffeffekte**

### *Organochlorverbindungen*

Während der letzten 50 Jahre hat die globale Belastung der Umwelt derart zugenommen, dass nahezu überall auf der Welt Rückstände von persistenten Chemikalien in Organismen nachzuweisen sind (Tanabe et al., 1983, Risebrough et al., 1990, Fletcher und McKay., 1993). Von besonderer biologischer Relevanz sind unter Anderem die persistenten, wasserunlöslichen polychlorierten Kohlenwasserstoffe, wie PCBs, PCDDs und PCDFs. Diese Stoffgruppen sind chemisch äußerst stabil, lipophil und akkumulieren in der Nahrungskette, wo sie einem metabolischen Abbau weitgehend widerstehen. In der Umwelt hat man es mit komplexen Mischungen von chlorierten Kohlenwasserstoffen zu tun: Alleine die PCB-Gruppe besteht theoretisch aus 209 Congeneren. Da diese Stoffe wasserunlöslich sind, binden sie im aquatischen Milieu an organischem Material. Dies führt auf der einen Seite zu einer fortwährenden Deposition in Sedimenten, auf der anderen Seite zu einer Aufnahme durch benthische und pelagische Organismen an der Basis der Nahrungskette, wie Muscheln, Zooplankton und Kleinkrebsen (Van der Oost et al., 1988, Picer und Picer, 1994).

Eine der Haupttrouten für die Verbreitung dieser Stoffklassen ist der atmosphärische Transport, der es möglich macht, dass diese Substanzen auch in arktischen und antarktischen Sedimenten und Lebewesen nachgewiesen werden können (Muir et al., 1992, Hargrave et al., 1988, Goercke und Weber, 2001).

Die durch DDT verursachte Ausrottung von Raubvögeln und anderen fischfressenden Vogelpopulationen in vielen Bereichen Nordamerikas und Europas führte zu einer Einschränkung der Produktion und zur Reglementierung der Freisetzung von DDT und PCBs

in den meisten industrialisierten Ländern während der siebziger Jahre. Als Folge davon gingen die Pestizidgehalte im Fettgewebe wildlebender Tiere zurück, was PCBs und, in einem geringeren Maße auch DDT betraf (Addison et al., 1986). Diese Abnahme reflektierte aber in erster Linie eine Ablagerung der Chemikalien in der Umwelt, mehr als einen Abbau. Die Remobilisierung in der Umwelt deponierter Rückstände, Leckagen aus Speicherreservoirs der Industrie, der uneingeschränkte Gebrauch in Entwicklungsländern und Niedrigtemperatur-Verbrennungsprozesse verlangsamten die Abnahme von chlororganischen Stoffen in der Umwelt in den 80er Jahren (Ross et al., 1996). Aktuelle Daten zeigen, dass sich die Belastung mit chlororganischen Rückständen in menschlichen und tierischen Organismen aus industrialisierten Gebieten stabilisiert hat, es zu einer Art Equilibrium im Zyklus dieser Kontaminanten gekommen ist (Hovinga et al., 1993). Ausbaggerungen von Hafengebieten, oder, wie im Verlauf der vorliegenden Studie im Fall der Elbe stattgefunden, ganzen Flussverläufen, verändern dieses Equilibrium empfindlich. Im Sediment abgelagerte Schadstoffe und deren Abbauprodukte werden freigesetzt und gelangen damit wieder in die Nahrungskette. Dies betrifft nicht nur chlororganische Kohlenwasserstoffe, sondern auch Schwermetalle und andere stabile Giftstoffe. Durch chemische Prozesse im Sediment können zudem noch weitere Metabolite entstehen, die mit der herkömmlichen Standardanalytik nicht erfasst werden können. Einzig die Überprüfung biologischer Effekte kann daher Auskunft über die Umweltrelevanz solcher Aktionen liefern.

Durch parallele umfangreiche rückstandsanalytische Untersuchungen, die an den selben individuellen Fischen, wie die biologischen Effekt-Messungen durchgeführt wurden, konnten direkte Zusammenhänge zwischen Modulation der nicht-spezifischen Immunantwort und der jeweiligen Schadstoffbelastung im Muskelgewebe ermittelt werden.

Obwohl es Korrelationen zwischen den PCB Konzentrationen der verschiedenen analysierten Metabolite gab, zeigte die vorliegende Studie Unterschiede in den immunmodulatorischen Effekten zwischen den einzelnen Congeneren. Für die MA-SP wurden die klarsten suppressiven Effekte mit den PCBs 52 und 101, sowohl in Flundern aus der Nordsee, als auch in Meeräschen aus dem Mittelmeer ermittelt. In Meeräschen verursachten auch PCB 28 und PCB 153 MA-SP-suppressive Effekte. Die PCBs 52 und 101 gehören zu der PCB Klasse mit unsubstituierten C-Atomen in m,p-Stellung und werden in allen Fischarten nur langsam eliminiert (Goerke und Weber, 2001, Niimi und Oliver, 1983, Guiney et al., 1997). Das mag ein Grund für die klare Korrelation zwischen der MA-SP Aktivität und der Rückstandskonzentration dieser Congenere in Geweben beider Fischarten sein. Zwei andere Substanzen, die deutliche Effekte auf MA-SP zeigten, sind HCB und OCS.

Während die immunmodulatorische Wirkung von PCBs und PAKs relativ intensiv untersucht ist (siehe auch Anfangsteil dieser Diskussion), gibt es zu den Effekten von HCB und OCS auf das Immunsystem von Fischen keine Informationen. Zu den Effekten von HCB, nicht aber von OCS, auf das Immunsystem von Säugetieren hingegen, wurden einige Studien durchgeführt. Untersuchungen von Daniel et al. (2001) wiesen einen supprimierenden Einfluss von HCB auf die Cytokinproduktion (IFN-gamma) nach. An Eskimokindern wurde nachgewiesen, dass die Infektionshäufigkeit von Mittelohrentzündungen mit der pränatalen Exposition von HCB zunimmt (Dewailly et al., 2000). Dies galt aber ebenso für Dieldrin und p,p-DDE, beides Substanzen, sie auch in der vorliegenden Studie Suppression von Makrophagenfunktionen verursachten. Die Immuntoxizität von HCB ist aber weit davon entfernt, aufgeklärt zu sein, da diese Substanz Teile des Immunsystems stimuliert, andere aber hemmt (zusammengefasst in Vos, 1986).

Wie auch schon im Fall der Makrophagenfunktionen aus der Kopfniere und anhand der Aktivität der MA-SP in der Leber demonstriert, so wurden auch bei den Korrelationen zwischen Schadstoffkonzentrationen und MA-SP Aktivität und MA-Größe geschlechts-

spezifische Unterschiede festgestellt. Diese betrafen insbesondere die rückstandsanalytischen Untersuchungen im Lebergewebe. Während in den männlichen Flundern die deutlichsten Zusammenhänge zwischen MA-SP und Schadstoffkonzentrationen im Lebergewebe ermittelt wurden, konnte in weiblichen Flundern nur ein einziger Zusammenhang zwischen PCB 28 und MA-SP Konzentration festgestellt werden und dieser war positiv. In den männlichen Fischen hingegen waren für fast alle Organochlorverbindungen signifikant negative Korrelationen nachgewiesen worden. Der Grund für diese Unterschiede mag in dem Zeitpunkt der Probennahme liegen. Anfang April ist die Laichsaison der Flundern aus der Deutschen Bucht gerade beendet. Während der Fortpflanzung mobilisieren weibliche Fische Fette aus der Leber und verlagern sie für die Eiproduktion in die Gonaden. Zusammen mit den Lipiden werden die lipophilen Schadstoffe aus der Leber in die Gonaden verlegt (Söffker, 2000). Auf diese Weise verringert sich die Konzentration chlororganischer, lipophiler Schadstoffe in der Leber. Dies mag ein Grund dafür sein, dass zu diesem Zeitpunkt in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang zwischen Schadstoffkonzentration in der Leber und MA-SP Aktivität gefunden wurde.

Ein anderer Grund kann in der engen Verbindung zwischen der Aktivität des unspezifischen Immunsystems und des weiblichen Fortpflanzungszyklus, wie oben bereits diskutiert, zu finden sein. Alle Ergebnisse deuten auf einen starken endokrinologischen Einfluss auf das Immunsystem weiblicher Flundern hin.

Ähnlich wie in den Untersuchungen anderer Autoren, so wurden auch in diesem Fall kontroverse Ergebnisse erzielt, was die Korrelationen zwischen Schadstoffgehalt im Gewebe und die Größe der Makrophagen Aggregate anging: Unterschiedliche Korrelationen, positive und negative, zwischen Organochlorkonzentration und MA-Größe wurde ermittelt, je nachdem ob die Rückstände in der Leber, oder im Muskelgewebe analysiert worden waren. Außerdem wurden verschiedene Korrelationen, positive und negative, ermittelt, je nachdem ob Flundern aus der Nordsee, oder Meeräschen aus dem Mittelmeer untersucht wurden.

Von allen analysierten Gebieten zeigten Meeräschen aus der Bucht von Haifa die höchste Konzentration an Organochlorverbindungen im Muskelgewebe. Nicht ein gering belasteter Fisch, zum Beispiel mit einer PCB 153 Konzentration unter der Nachweisgrenze, wurde auf dieser Station gefangen. In den Meeräschen wurde eine negative Korrelation zwischen MA-SP und MA-Größe beobachtet. Das selbe wurde festgestellt in Flundern aus der Nordsee, wenn die Rückstandsanalytik am Lebergewebe durchgeführt wurde, anstatt im Muskel. Auch in diesem Fall waren die Konzentrationen der Organochlorverbindungen besonders hoch (HCB zum Beispiel 100 mal höher, als im Muskelgewebe). Im Gegensatz dazu wurden im Roten Meer auch Fische mit PCB Konzentrationen unter der Nachweisgrenze gefangen. In diesen Fischen waren MA-Größe und Rückstandskonzentrationen positiv korreliert. Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass bei geringer Belastung, die aber bereits die MA-SP Aktivität herabsetzt, diese Suppression durch den Aufbau größerer Aggregate kompensiert wird. Ein ähnliches Phänomen ist bekannt in Menschen, die unter der Chronisch-granulomatösen Krankheit leiden (CGD). Eine chronisch herabgesetzte Aktivität von Phagozyten ist dabei von der Formation großer Granuloma begleitet (Curnutte et al., 1976, Thrasher et al., 1994).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten hochkontaminierten Fische haben eventuell die Potenz zur Kompensation der herabgesetzten MA-SP- Aktivität durch Vergrößerung der Aggregate verloren. Diese Hypothese wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die Anzahl der MA im Lebergewebe mit steigender Belastung der Meeräschen abnimmt und sie in belasteten Gebieten signifikant erniedrigt ist. In der Deutschen Bucht fanden wir beides: hochbelastete Fische in der Elbemündung und gering belastete Flundern auf den Außenstationen. Sogar auf der am höchsten belasteten Station wurden niedrigere Konzentrationen von Organochlorverbindungen im Fischgewebe nachgewiesen, als in den

Meeräschen aus der Bucht von Haifa. In diesen Flundern wurde ebenfalls eine positive Korrelation zwischen Schadstoffgehalt und MA-Größe nachgewiesen. Unsere Hypothese ist daher: Eine moderate Belastungssituation macht eine Kompensation der herabgesetzten MA-SP noch möglich, aber mit steigender Belastung wird diese Kompensation verhindert, zum Beispiel durch die toxisch bedingte Suppression der Chemotaxis der Makrophagen, wie sie von anderen Autoren durch Einfluß von Umweltbelastung, PCB, Quecksilber und HCH nachgewiesen worden ist (Weeks et al., 1986, Sweet, 1999). Freilanduntersuchungen von Pulsford et al. (1995) am Goby in der Lagune von Venedig zeigten zahlreiche immunmodulatorische Effekte auf der am höchsten belasteten Station. Der Anteil von Phagozyten im Blut war auf dieser Station erhöht, ein Ergebnis, das auch für Klieschen galt, die kontaminierten Sedimenten ausgesetzt wurden (Bucke et al., 1989, Pulsford et al., 1992). Daneben war in Gobies die Phagozytosekapazität von adhären Zellen der Milz niedriger. Diese beiden Ergebnisse: Höhere Anzahl von Phagozyten bei herabgesetzter Phagozytosekapazität könnte auch ein Hinweis auf mögliche „Kompensierung“ sein.

Die Anwendung morphometrischer MA-Parameter für die Überprüfung potentieller Immunmodulation alleine ist also nicht aussagekräftig. In Verbindung mit funktionellen Parametern aber, wie der MA-SP Aktivität kann die MA-Größe nützlich sein, um den Grad der Schädigung abschätzen zu können. Die folgende Hypothese, die sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergibt, wird in zukünftigen Studien in unserem Labor überprüft werden:

MA-SP	↓	MA-Größe	↑	→ moderate Effekte- Kompensation
MA-SP	↓	MA-Größe	↓	→ starke Effekte- keine Kompensation

### *Weitere MA-Funktionen*

Die Aktivität eines weiteren Enzyms, der G6PDH, die in Makrophagen der Kopfniere von Flundern der belasteten Station nach Stimulierung mit PMA signifikant supprimiert war, zeigte in MA der Leber von Mugiliden und Siganiden keine lineare Entwicklung unter Schadstoffeinfluß. Bei einsetzender, relativ geringer Belastung stieg die G6PDH Aktivität an, um dann in höher belasteten Fischen abzunehmen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Fischarten durch akuten Schadstoffeinfluss beschrieben. Unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von Chlorothalonil wurde von Baier-Anderson und Anderson (1998) in isolierten Makrophagen aus *Morone saxatilis* neben der Erzeugung von ROS auch die Konzentration von NADPH gemessen. Bei geringen Schadstoffkonzentrationen (10 und 100 µg/l TCIN) war die NADPH-Konzentration erhöht, bei hohen Konzentrationen (500 µg/l) erniedrigt.

Einen identischen Verlauf zeigte auch die ROS Produktion. Auch sie war bei geringen Konzentrationen erhöht. Dies wurde als "Hormesis" diskutiert, ein Phänomen, das unter Einfluss geringer Schadstoffkonzentrationen bekannt ist und durch die Induktion von Zellschutzmechanismen verursacht wird (Mehendale, 1992, Cramer et al., 1995).

Die Aktivität der G6PDH in der Leber von *Tilapia* zum Beispiel erhöhte sich durch 2,4-D und Azinphosmethyl Exposition (Oruc und Uener, 2000). Die Autoren diskutierten diese Erhöhung als Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress, hervorgerufen durch diese Pestizide.



Die starke Variabilität der G6PDH Aktivitäten zwischen den Lebern verschiedener Fischarten wurde bereits von Shimeno und Takeda (1973) beschrieben und wurde auch in dieser Arbeit deutlich. Während die G6PDH im Lebergewebe der Flundern so hoch war, dass sie mit Hilfe von Absorbionsmessungen kaum zu erfassen war, erreichte sie in Mugiliden und Kaninchenfischen allerhöchstens ein Drittel dieser Aktivität.

Die zelluläre Aktivität der G6PDH ist wichtig für verschiedene Funktionen der nicht-spezifischen Immunantwort (Spolarics und Wu, 1997). Die Regulation der G6PDH-Aktivität ist gewebespezifisch (Kletzin et al., 1994). In Leberzellen von Säugetieren wird die Genexpression ernährungsabhängig durch Kohlenhydrate und Lipide reguliert, sowie durch glycogene und lipogene Hormone. Die erhöhte G6PDH-Aktivität stellt NADPH zur Verfügung, das für die Synthese von Fettsäuren benötigt wird.

Stimulierte G6PDH Aktivität wurde außerdem in proliferierenden Zellen ermittelt (Stumpf und Bannasch, 1994), als Antwort auf oxidativen Stress (Mochitate et al., 1992), sowie nach Stimulierung mit Lipopolysacchariden von Gram-negativen Bakterien (LPS) (Spolarics und Navarro 1994). In Studien an Ratten wurde festgestellt, dass TNF-alpha in der Lage ist, die Genexpression der G6PDH und ihre Aktivität in Kupfferzellen und Endothelzellen signifikant zu erhöhen (Spolarics und Wu, 1997). Ebenso wurde auch die Aktivität der PGDH erhöht. Diese Studien zeigten, dass sich die Aktivitäten von G6PDH und PGDH sowohl in Leberzellen als auch in Leukozyten parallel entwickelten, was zu der Annahme einer Koordinierung der Expression dieser beiden Enzyme führte.

Rezeptoren für humanes TNF-alpha (Hardie et al., 1994, Jang et al., 1995) und in aktuellen Studien auch TNF-alpha ähnliche Moleküle (Qin et al., 2001) wurden in Makrophagen von Regenbogenforellen nachgewiesen. Im Steinbutt führte eine Kombination von LPS und humanem TNF-alpha zu einer signifikanten Induzierung der NO-Produktion von Makrophagen, die alleine mit LPS nicht zu induzieren waren (Tafalla und Novoa 2000). Auch dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Schlüsselrolle von TNF- alpha bei der Aktivierung von Fischmakrophagen. Die im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelte Suppression der G6PDH und der PGDH in Makrophagen aus der Kopfniere von Flundern aus belasteten Küstengebieten könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Produktion TNF-alpha ähnlicher Moleküle in den Immunzellen bei chemischer Belastung herabgesetzt ist. In weiblichen Fischen ist die Suppression der G6PDH stärker, als in ihren männlichen Artgenossen. Langzeitstudien in verschiedenen Meeresgebieten zeigten ein häufigeres Auftreten von Tumoren in weiblichen Fischen belasteter Meeresgebiete (Köhler, eingereicht). Eine Inhibition des TNF-alpha wurde in neueren Studien an humanen Blutzellen unter Einfluß verschiedener PCBs ermittelt (Ahne und Jarre, 2002). Die Herabsetzung der TNF-alpha Freisetzung war konzentrationsabhängig. Einen inhibierenden Einfluß auf humane periphere Blutzellen zeigten auch Atrazin, Simazin, Metoxuron, Mekoprop und Diuron, alles angewendete Herbizide (Hooghe et al., 2000). Im Verlauf unspezifischer Immunreaktionen bei Säugetieren stellt die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten durch eingewanderte oder sessile Makrophagen die Hauptursache für oxidativen Stress in der Leber und anderen Geweben dar (Spolarics, 1998). Die Konsequenz des oxidativen Stresses hängt von der Aktivität radikalabfangender Systeme ab. Hierbei spielt die Aktivität der G6PDH eine Schlüsselrolle. Alle wichtigen Enzyme, die ROS metabolisieren, also bilden, oder abbauen, sind direkt oder indirekt auf die Nutzung von NADPH angewiesen: Glutathion Peroxidase, Glutathion Reduktase, NADPH Oxidase, Catalase, Superoxid Dismutase, Nitrit Oxid Synthase (Spolarics, 1998).

Ein weiterer immunologischer Parameter, der von der Infektion der Meeräschen mit *Myxobolus* sp. weitestgehend unbeeinflusst blieb und seinerseits eine hochsignifikante negative Korrelation mit den Schadstoffkonzentrationen (Organochlorverbindungen) zeigte, war die Aktivität der PGDH in Makrophagen Aggregaten der Leber. Wie schon an isolierten Makrophagen der Kopfniere demonstriert, scheint bei der Aktivität dieses Enzyms eine deutliche Hemmbarkeit durch Schadstoffe vorzuliegen. Studien über die Veränderung der PGDH Aktivität durch Schadstoffe liegen für aquatische Lebewesen nicht vor. Die einzigen Untersuchungen an Säugetieren berichten über eine Induzierung der PGDH und der G6PDH in der Leber von Ratten durch akuten Einfluss von PCBs, HCB und DDT (Boll et al., 1994, 1998). Untersuchungen über die Reaktion der PGDH Aktivität unter chronischer Belastung mit Organochlorverbindungen liegen nicht vor.

### *Schwermetalle*

Metallbelastung ist bekannterweise ein Umweltstress, der einen signifikanten Selektionsdruck auf Organismen ausüben kann (Posthuma et al., 1993, Troncoso et al., 2000).

Die Effekte von Schwermetallen auf natürliche Ökosysteme sind komplex und häufig unvorhersehbar (Depledge et al., 1995). Die Anwendbarkeit von Ergebnissen ökotoxikologischer Untersuchungen aus Laborstudien auf Belastungssituationen in der natürlichen Umwelt ist daher begrenzt.

Diese Studie gibt als eine der ersten Untersuchungen einen deutlichen Hinweis darauf, dass die in küstennahen Gewässern der Nordsee und des Mittelmeeres vorherrschenden Kupferkonzentrationen in der Lage sind, hochsignifikante Modulationen der Makrophagenfunktionen zu induzieren.

Metalle können nach ihren biologischen Effekten in zwei Gruppen eingeteilt werden: Essentielle Metalle (Oligoelemente), die in physiologischen Dosen für den Metabolismus nötig sind (Cu, Zn, Mg, Mn, Fe...) und toxische Metalle (Cd, Pb, Hg, As...) (Larsson et al., 1981, Dalal und Bhattacharya, 1994). Verschiedene Metalle sind in der Lage die Immunantwort von Fischen zu modulieren (zusammengefasst von Zelikoff, 1993).

Der stärkste suppressive Effekt von Schwermetallkonzentrationen im Fischgewebe auf die MA-SP Aktivität in Flundern wurde für Kupfer festgestellt. Die Belastung mit Kupfer stellt seit über einem Jahrhundert ein besonderes Problem für die marine Umwelt dar. Während in früheren Zeiten der Abbau von Kupfer den größten Eintrag in die Meere verursachte, sind es heutzutage urbane Einleitungen, Industrieabwässer und insbesondere, als Folge des TBT-Anwendungsverbotes in nahezu allen europäischen Ländern, Schiffsfarben auf Kupferbasis (Pipe et al., 1999), die jetzt immer weitere Verbreitung finden werden.

Kupfer wird in verschiedenen Schiffsanstrichen als Ersatz des hochtoxischen TBT eingesetzt ein fataler Ersatz, wie zahlreiche Studien über die Toxizität von Kupfer in marinen Organismen belegen. Besonders das Immunsystem der Fische scheint durch den Einfluss dieses Metalles geschädigt zu werden (Sindermann, 1979, 1996, Zelikoff, 1993). Arbeiten von Romeo et al. (2000) unterstrichen eindrucksvoll die hochtoxische Wirkung von Kupfer auf Zellen des Pronephros von *Dicentrarchus labrax*. Verglichen mit der Wirkung von Cadmium, zeigten mit Kupfer injizierte Fische deutlich höhere Lipidperoxidation, gemessen als Erzeugung von Malondialdehyd. Die Stabilität lysosomaler Membranen war durch den Einfluss von Kupfer stärker herabgesetzt, als durch Cadmium. Neben einer Herabsetzung der Membranstabilität wurde auch eine Lysosomenvergrößerung in den Kopfnierzellen festgestellt.

Romeo et al. (2000) verglichen auch die Hauptakkumulationsorte für Cadmium und Kupfer in *D. labrax* und stellten fest, dass injiziertes, hochkonzentriertes Cadmium in der Niere und Kupfer in der Leber akkumuliert wurde.

In der vorliegenden Studie wurde in Fischen aus allen drei untersuchten Meeren eine erhöhte Konzentration von Kupfer im Muskelgewebe der Referenztiere gemessen. Da der Hauptakkumulationsort von Kupfer aber die Leber ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentrationen in der Leber noch wesentlich höher lagen.

Am deutlichsten waren die Unterschiede in den Belastungen mit Kupfer zwischen Mugiliden von Referenz- und belasteter Station im Mittelmeer. Hier zeigten Fische von der Referenzstation Maagan Michael wesentlich höhere Kupferkonzentrationen im Muskelgewebe, als Meeräschen aus der hochbelasteten Haifa Bay. Die Speicherung von Kupfer in der Leber ist gewöhnlich mit der Induktion von Metallothionein (MT) verbunden (Bunton et al., 1987), die zu einer Eliminierung dieses Metalles führt. Allerdings zeigten Kupfer-Injektionsexperimente (500 ng/g, i.p.) an *D. Labrax*, dass eine signifikante Aufnahme dieses Metalles in der Leber stattfand. Die Konzentration von MT lag allerdings unter der Konzentration, die in den Kontrolltieren gemessen worden war (Romeo et al., 1997). Die Autoren schlossen daraufhin auf eine toxische Schädigung der MT-Synthese durch hohe Konzentration von Kupfer.

Unter Feldbedingungen ist, bei extrem hoher chronischer Belastung mit unterschiedlichen Schadstoffen, wie zum Beispiel an der Israelischen Mittelmeerküste (Diamant et al., 1999) und im Ästuarbereich der Elbe (Köhler und Pluta, 1995) in verschiedenen Fischarten ein Rückgang der EROD Aktivität nachgewiesen worden. Wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert wurde, ist auch die Aktivität anderer Enzyme, wie zum Beispiel der G6PDH, in Fischen aus stark belasteten Gebieten herabgesetzt. Die Belastungssituation scheint also in einigen Gegenden bereits so hoch zu sein, dass es zu einer Störung der Proteinbiosynthese kommt. So stellten Buko et al., (1999) fest, dass durch Lipidperoxidation entstehende Aldehyde in der Lage sind, CYP450 zu hemmen. Ist in diesem Zusammenhang auch die Synthese von Metallothionein betroffen, so kann dies für die toxische Wirkung von Kupfer auf die betroffenen Organismen fatale Folgen haben. In diesem Fall könnte die Homöostase der Leberzellen mit den von außen einwirkenden Schwermetallen eventuell nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Immunsuppressionen durch den Einfluss von Kupfer wurde bereits bei zahlreichen Fischarten beschrieben:

Kupfer und Cadmium in sublethalen Dosen inhibierten nach in vivo Injektion bei *D. labrax* sowohl die Phagozytose, als auch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch Makrophagen. Die Inhibition durch Kupfer erfolgte bereits bei geringeren Dosen, als durch Cadmium (Halbierung der Aktivität durch Kupfer bereits bei 250 µg/kg, durch Cadmium bei 1 mg/kg) (Bennani et al., 1996). Diese Effekte wurden bereits nach 48 Stunden gemessen. Es handelt sich also um eine akute Reaktion der Phagozyten. Außerdem stellten die Autoren fest, dass phagozytierte *Aeromonas salmonicida* auch 2 Stunden nach der Phagozytose in den Makrophagen noch intakt waren und dass keine großen Phagosomen zu erkennen waren. In verschiedenen Fischarten wurde von einer Zerstörung der phagozytierten Mikroorganismen innerhalb der ersten beiden Stunden nach der Phagozytose berichtet (Olivier et al., 1986, Bennani et al., 1995, Graham et al., 1988). Dies deutet auf eine herabgesetzte Aktivität der SP- Aktivität in den Makrophagen, sowie auf eine Lysosomenfunktionsmodulation hin.

Auch in Aalen und Katzenwelsen wurde eine Herabsetzung der Phagozytoseaktivität durch Einfluss von Kupfer und Cadmium beschrieben (Mushiak et al., 1985, Khangarot und Tripathi, 1991). Cadmium in der Wasserphase führte in anderen Studien in der Regenbogenforelle zur Stimulierung der Phagozytoseaktivität (Enane et al., 1991).

Ein weiteres Metall, dessen Konzentration im Flundergewebe hochsignifikante Korrelationen sowohl mit MA-SP, als auch mit der Größe der Aggregate zeigte, war Quecksilber. Hohe Konzentrationen induzierten die MA-SP Aktivität und führten zu Vergrößerung der Aggregate. Dieses Metall wirkte also stimulierend auf die Makrophagen Aggregate. Es liegen einige Arbeiten vor, die den Einfluss von Quecksilber auf die Aktivität der Sauren Phosphatase in Fischen untersucht haben. Sublethale Dosen von Quecksilber inhibierten die Saure Phosphatase in der Niere von *Boleophthalmus dentatus* konzentrationsabhängig (Lakshmi et al., 1991). Auf der anderen Seite wurde die Aktivität der SP im Lebergewebe von *Heteropneustes fossilis* durch den Einfluss von Quecksilber erhöht (Gupta und Sastry, 1981).

In der vorliegenden Studie wurden, was die Effekte von Kupfer auf die MA-SP Aktivität angeht, gegensätzliche Ergebnisse in Flundern und Meeräschen erzielt. Während Kupferkonzentration und MA-SP in Flundern signifikant negativ miteinander korreliert waren, zeigten diese beiden Parameter in Meeräschen eine signifikant positive Korrelation. Der Grund für diese Beobachtungen liegt unter Umständen in der Infektion der Leber eines Teiles der Meeräschen mit *Myxobolus* sp.. Kupfer führte zu einer hochsignifikanten Hemmung der Nitrit Oxid Synthetase (NOS) in den MA der Lebern, sowie in den Gallengängen. Diese Inhibition, gerade an den Stellen der möglichen Einwanderung der Parasiten aus der Galle, den Gallengängen könnte für die Leberinfektionen mit verantwortlich sein. Die Infektionen wiederum haben einen stimulierenden Einfluss auf die Aktivität der SP in den Aggregaten der Leber. Es kann daher spekuliert werden, dass die positive Korrelation zwischen Kupferkonzentration und MA-SP über das Zwischenglied: Hemmung der NOS, geführt haben könnte. Diese Hypothese wurde auch dadurch unterstützt, dass eine negative Korrelation zwischen Kupferkonzentration und MA-SP Aktivität zu beobachten war, wenn alleine die nicht infizierten Meeräschen in die statistische Untersuchung einbezogen wurden.

### **NOS-Hemmung**

Um den möglichen Weg der NOS Hemmung durch Kupfer zu verfolgen, muß im Folgenden kurz auf den strukturellen Aufbau dieses Enzyms eingegangen werden.

Was die NOS von allen bekannten Cytochrom P450 Enzymen unterscheidet, ist H<sub>4</sub>B (siehe Einleitung). Eine direkte Rolle von H<sub>4</sub>B für die katalytische Funktion der NOS konnte bis jetzt nicht festgestellt werden, aber eine Hypothese ist, dass es an der NOS-Reaktion als ein Redox-aktiver Cofaktor bei der Substrat-Hydroxylierung partizipiert, analog zu anderen H<sub>4</sub>B-abhängigen Enzymen. Im Fall der NOS wäre dies die Umsetzung von L-Arginin zu NG - Hydroxy-L-Arginin (NHA) (Perry und Marletta, 1998). Eine Voraussetzung hierfür ist die Bindung von Eisen, das nicht zum Häm gehört, das mit H<sub>4</sub>B eine aktive Reaktionsstätte bildet- für diese Funktion eine wesentliche Grundvoraussetzung.

Perry und Marletta (1998) wiesen nach, dass die NOS nicht nur Nicht-Häm Eisen binden kann, sondern auch andere zweiwertige Metalle. Eisen erhöht die Reaktionsrate der NOS, während sie durch andere zweiwertige Metalle, wie Kupfer und Zink gehemmt wurde. Auch andere Enzyme, die von Nicht-Häm Eisen abhängig sind, wurden durch Übergangsmetalle inhibiert: die Isopenicillin-N Synthase (Cu, Co), die Taurin Dioxygenase (Cu, Zn) und die Phenylalanin Hydroxylase (Cu, Zn).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Kupferkonzentrationen, wie sie in der marinen Umwelt, und nicht nur auf den bekannt belasteten, sondern insbesondere auf den sogenannten Referenzstationen vorkommen, durchaus einen negativen Einfluss auf die Abwehrkräfte der Fische haben könnten. Die konzentrationsabhängige Inhibition der NOS in Fischen aus dem Mittelmeer mag die zentrale Ursache für die parallel dazu beobachtete Infektionshäufigkeit mit Einzellern in der Leber dieser Meeräschen darstellen.

Alle anderen untersuchten Aktivitätsparameter, wie die Aktivität der Sauren Phosphatase, der G6PDH und die Anzahl der MA in der Leber stiegen im Gegensatz dazu in infizierten Meeräschen mit steigender Konzentration von Kupfer im Fisch an.

Die Beziehung zwischen der Zytotoxizität von Makrophagen gegenüber Parasiten und der erhöhten Produktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffmetabolite ist allgemein bekannt (Mauel, 1982, Thorne und Blackwell, 1983, Granger, 1991, Liew, 1993, Didier, 1995, Clark und Rockett, 1996).

Untersuchungen an murinen Makrophagen haben ergeben, dass die Produktion von NO mit der Zerstörung von Mikrosporidien (*Enzcephalitozoon cuniculi*) korreliert ist. Eine Hemmung der NO Produktion durch den spezifischen Inhibitor der NOS NMMA, setzte die Abtötung der Mikrosporidien herab (Didier et al., 1994, Didier, 1995). Die Aktivität der NOS scheint daher für die erfolgreiche Abwehr von Mikrosporidien von außerordentlicher Wichtigkeit zu sein. Untersuchungen dieser Art liegen für die Infektion mit Myxosporidien nicht vor. Die NOS war in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lebern der Meeräschen auch im Gallengangsepithel aktiv und auch dort durch den Einfluss von Kupfer in ihrer Aktivität herabgesetzt. Dies mag den Parasiten den Eintritt in die Leber erleichtert haben. Die Konzentration von Kupfer war in der vorliegenden Studie in Meeräschen der Referenzstation, auf der auch eine erhöhte Infektionsdichte ermittelt wurde höher, als in Fischen der belasteten Bucht von Haifa.

### **Saure Phosphatase Hemmung**

Die Sauren Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse von synthetischen oder natürlichen Monophosphoestern, verbunden mit der Freisetzung von anorganischem Phosphat und basischem Alkohol, Phenol, etc. (Buchwald et al., 1984). Obwohl die biologische Rolle der Sauren Phosphatasen noch weitgehend unbekannt ist, deutet ihre Rolle im Phosphatmetabolismus und ihre ubiquitäre Verbreitung auf die Wichtigkeit dieses Enzyms in der Zellphysiologie hin (Panara, 1997). Zwei Hauptklassen der Sauren Phosphatase wurden bisher in den Geweben höherer Vertebraten beschrieben: Die partikuläre, meist lysosomale Hochmolekulargewicht-Form (HMW) und die zytosolische Niedrigmolekulargewicht-Form (LMW) (De Arujo et al., 1976, Chen und Chen, 1988, Panara et al., 1993). Während die Sauren Phosphatasen in Säugetieren ausführlich charakterisiert sind, gibt es nur wenige Studien über diese Enzyme in niederen Vertebraten. Arbeiten am Karpfen zeigten drei Isoenzyme der HMW- SP in der Leber (Janska und Kubicz, 1985). Intensive Studien von Panara (1997) über die Sauren Phosphatasen in verschiedenen Geweben des Hechtes zeigten, dass der Gehalt an Saurer Phosphatase, die Struktur der Enzyme und ihre Funktionen ähnlich denen der Säugetieren sind. Er folgerte aus dieser Konservierung während der Evolution, dass sich die Saure Phosphatase gut für die Untersuchung molekularer und funktionaler Adaptationen von Fischen eignet und einen Vergleich mit anderen Vertebratenklassen zulässt. Besonders Hohe Aktivitäten wurden in der Milz des Hechtes gemessen. Die Milz ist der Hauptaufenthaltort von Makrophagen Aggregaten in dieser Fischart.

Die hochmolekulare, lysosomale Form wurde in der vorliegenden Arbeit in Lysosomen von Fischmakrophagen untersucht. Diese Form hydrolysiert eine große Zahl von Phosphoestern und scheint in den katabolischen Prozess in Lysosomen eingebunden zu sein.

In Grünalgen wurde von einer Suppression der Sauren Phosphataseaktivität durch den Einfluss von UV-B und Kupfer berichtet (Rai und Rai, 1997). Die Autoren machten die erhöhte Aufnahme von Kupfer durch die durch UV-B geschädigte Membran für die Herabsetzung der Enzymaktivität verantwortlich.

Untersuchungen am indischen Karpfen (*Catla catla*) zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Sauren Phosphatase Aktivität durch sublethale Dosen von Chrom in der Leber und im Verdauungstrakt (Vincent et al., 1995). Ebenfalls konzentrationsabhängig hemmten sublethale Gaben von Quecksilberchlorid die Aktivität der Sauren Phosphatase in der Niere des Süßwassergobiiden *Boleophthalmus dentatus* (Lakshmi et al., 1991). Die Autoren diskutierten einen Zusammenhang zwischen der Labilisierung lysosomaler Membranen durch Quecksilber und der Herabsetzung der Enzymaktivität. Auch die membrangebundene Alkalische Phosphatase wurde durch Quecksilberchlorid in ihrer Aktivität gehemmt. In der Leber von *Heteropneustes fossilis* hingegen wurde eine Erhöhung der SP Enzymaktivität unter Einfluss von Quecksilberchlorid gemessen, G6PDH und Alkalische Phosphatase waren signifikant gehemmt (Gupta und Sastry, 1981). Methylquecksilber induzierte eine nicht-competitive Inhibition der sauren Phosphatase, gemessen in Leberhomogenaten von *Ictalurus punctatus* (Hinton und König, 1975).

Weitere Untersuchungen an Leber und Niere von *Heteropneustes fossilis* unter Einfluss von Kupfer und Cadmium zeigten eine Inhibition der Sauren Phosphatase und der ATPase in der Leber der Fische (Gupta und Rajbanshi, 1985). Blei zeigte keine Effekte auf die SP-Aktivität in der Leber, inhibierte aber die G6PDH Aktivität signifikant (Sastry und Gupta, 1979). Cadmium führte in der Verdauungsdrüse von Krabben zu einer Inhibition der Sauren Phosphatase Aktivität (Dhavale und Masurekar, 1986). In der Leber von *Channa punctatus* hingegen wurde eine Steigerung der SP-Aktivität verursacht durch Cadmium festgestellt (Dubale und Shah, 1981).

Außer diesen Schwermetallen führte auch Alkylbenzolsulfonat in der Leber von *Channa punctatus* zur Hemmung der Sauren Phosphatase und auch der G6PDH (Mathur et al., 1990). Phenole (P, DNP, PCP) hemmten die SP-Aktivität in Gehirn, Niere und Leber des Süßwasserfisches *Notopterus notopterus* (Gupta, 1987, Dalela et al., 1980). Signifikante Inhibition der SP wurde ebenfalls in der Leber des Süßwasserfisches *Nemachelius denisonii* (Day) nach sublethalen Dosen des Herbizids Basalin (Fluchloralin) festgestellt (Rashatwar und Ilyas, 1983), sowie in der Hämolymphe von Krabben (*Rhithropanopeus harrisi*) nach Rohöl-Exposition (Drewa et al., 1979).

Die Inhibition der Sauren Phosphatase in aquatischen Organismen wird also durch eine Vielzahl verschiedener Stoffklassen verursacht und muss daher, ähnlich wie die Stabilität der lysosomalen Membranen als ein Indikator für nicht spezifische toxische Effekte, in diesem Fall auf das Immunsystem angesehen werden.

Herabsetzung der Aktivität der lysosomalen SP und Durchlässigkeit, beziehungsweise Schädigung der lysosomalen Membran scheinen in einem engen Verhältnis zu stehen. Dabei ist es durchaus möglich, dass eine Herabsetzung der Aktivität bereits in einem sehr frühen Stadium der Membranschädigung eintreten kann, nämlich dann, wenn es der Zelle nicht mehr möglich ist, durch aktive Ansäuerung der Lysosomen den optimalen niedrigen pH-Wert innerhalb dieser Zellorganelle gegenüber dem Zytoplasma aufrecht zu halten. Herabsetzung der Stabilität lysosomaler Membranen durch Schadstoffeinfluss wurde bereits von zahlreichen Autoren beschrieben. Die meisten Untersuchungen bezogen sich auf Zellen der Mitteldarmdrüse von Muscheln (Viarengo et al., 1985, Moore 1985, Shepard und Bradley, 2000), aber auch in Fischhepatozyten wurde eine enge Verbindung zwischen Schadstoffwirkung und Membrandestabilisierung nachgewiesen (zusammengefasst in Köhler 2002). Die Auswirkungen von Schadstoffen auf lysosomale Membranen von Immunzellen sind demgegenüber noch relativ unerforscht. Studien an Hämocyten der Miesmuschel zeigten allerdings eine Herabsetzung der Stabilität lysosomaler Membranen unter Einfluss von Kupfer (Nicholson, 2001). Die in der vorliegenden Studie beobachtete Herabsetzung der Aktivität der lysosomalen Sauren Phosphatase in Makrophagen kann also durchaus mit einer

parallelen Herabsetzung der Membranstabilität verbunden sein und eventuell darin ihre maßgebliche Ursache haben. Weitere Studien an isolierten Makrophagen werden einen Hinweis geben, ob Membrandestabilisierung die zentrale Ursache der beobachteten Enzyminhibition darstellt.

### **MA-SP Aktivität im integrierten Monitoring**

Obwohl die oben aufgeführten, zahlreichen experimentellen Studien an Fischen, durchgeführt vor allem in den achtziger Jahren, eine potentielle Nutzung der Sauren Phosphatase als Marker für nichtspezifische toxische Effekte nahelegten, gibt es nach unserem Wissensstand keine Freilanduntersuchungen über die Effekte von Schadstoffmixturen, wie sie in belasteten Küstenregionen vorliegen, auf die Reaktion dieses Enzyms. Auch Studien über die Nutzung der Sauren Phosphatase als Marker für toxisch bedingte Immunmodulation liegen sowohl im aquatischen, als auch im Säugetierbereich nicht vor. Mit dieser Arbeit ist der Anfang gemacht, diese Lücke zu schliessen. Die Aktivität dieses Enzyms in Makrophagen hat sich in der vorliegenden Studie, in denen ebenfalls bereits validierte Biomarker eingesetzt wurden, als der sensitivste und integrativste Marker für die Umweltbelastung in der deutschen Bucht erwiesen.

In dieser Arbeit wurden parallel zu der Ausbaggerung der Elbeflussbettes Studien über biologische Effekte an Flundern aus dem Flussmündungsgebiet und zweier vorgelagerter Stationen in der Deutschen Bucht durchgeführt. Bei der Elbe handelt es sich nach wie vor um einen der am höchsten belasteten Flüsse Europas (De Jong et al., 1999). Wie in Kapitel 3 ausführlich dokumentiert, waren in den Jahren nach der Ausbaggerung erhebliche Verschlechterungen der Biomarkerantwort in Flundern, nicht nur in Individuen der Elbe, sondern auch in den Fischen der vorgelagerten Stationen Eider und Tiefe Rinne zu beobachten. Dies wurde außerdem dadurch nachgewiesen, dass für die Elbe typische Chemikalien wie OCS und HCB in erheblichen Konzentrationen im Muskelgewebe von Flundern der drei Stationen nachgewiesen werden konnten (Broeg et al., 2002, in press). Deutlich wurde dadurch, dass die angewendete Biomarkerbatterie in der Lage war, die Effekte gerade dieser persistenten Kontaminanten sensibel zu reflektieren. Die Folgen von bis dahin unbemerkten Schadstoffeinträgen in die Elbe, wie im Frühjahr 1996 (hohe DDT und PCB Konzentrationen) wurden mit Hilfe dieser Biomarkerkombination sichtbar gemacht (Broeg et al., 1999).

Vergleichende Studien im Mittelmeer und im Roten Meer zeigten, dass, obwohl in diesen Bereichen generell auch andere Schadstoffklassen, wie zum Beispiel PAKs und auch Medikamente aus der Aquakultur zusätzlich auf die Organismen einwirkten (Bresler und Abelson, persönliche Kommunikation), sich die gemessenen immunmodulatorischen Effekte zum Teil auf die Rückstände von PCBs im Muskel der untersuchten Fische zurückführen ließen.

Zieht man die weltweite Verbreitung dieser persistenten Chemikalien in Betracht, so steht mit der hier eingesetzten Kombination von Biomarkern ein zuverlässiges Instrument für das biologische Effektmonitoring zur Verfügung. Und das nicht nur in Küstengebieten, sondern auch in Gebieten, die fern von jedem direkten Eintrag lokalisiert sind, zum Beispiel in der Arktis und der Antarktis. Denn wie die vorliegenden Studien an Kaninchenfischen aus dem Roten Meer zeigen, können auch bei geringen Belastungen Effekte bestimmter Biomarker gemessen werden. Mit Hilfe der "Skala der Biomarkerantwort" kann dann eine Einordnung in Schädigungsklassen vorgenommen werden.

## Parasiten

Im Kampf gegen Parasiten spielt bei Fischen wie bei Säugetieren und Vögeln die zelluläre, nicht spezifische Immunabwehr eine Schlüsselrolle (Cohen und Warren, 1982, Secombes und Chappel, 1996). Im Anfangsstadium der Zysten-, bzw. Plasmodienbildung als Reaktion auf *Myxobolus sp.* wurde in der vorliegenden Arbeit die Bildung von epitheloiden Zellen beschrieben (Kapitel 5). Diese entstanden immer in Zusammenhang mit Makrophagen Aggregaten, entweder am Rand der Aggregate, oder in deren Mitte. Diese Differenzierung von Makrophagen in epitheloide Zellen wurde auch für die Granulomabildung aufgrund von Tuberkelbazilleninfektion beschrieben um eine Barriere gegen die Ausbreitung der Infektion zu schaffen (Bouley et al., 2001). Während einige Studien die Epitheloidzellen als nicht phagozytotisch, wohl aber sekretorisch beschreiben (Papadimitriou und Spector, 1971, 1972), sind andere Autoren der Auffassung, dass sie die eigentlich phagozytierenden und bioziden Zellen von Granulomen darstellen (Adams, 1976, Cohn, 1968). Epithelzellen und Makrophagen wurden in der Leber von Fischen öfter als verschiedene Zustände eines Zelltypes beschrieben (Ferri und Sesso, 1981). Wie in der weiteren Diskussion noch besprochen wird ist es daher fraglich, ob es sich bei den Makrophagen an den Sinusoiden von Fischen bereits um "echte" Kupfferzellen handelt.

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit von diesen epitheloiden Zellen, die die Außenbegrenzung des Plasmodiums bildeten die höchste NOS-Aktivität, sowie eine extrem hohe G6PDH Aktivität ausging, lässt auf eine Art „Arbeitsteilung“ der verschiedenen Zelltypen bei dem Abbau und der Tötung von Myxobolussporen schließen. Während von Makrophagen, die außen an der Zyste lokalisiert waren, Saure Phosphatase in das Plasmodium sezerniert wurde, zeigten die Epitheloidzellen, die die Plasmodienhülle bildeten, NOS Aktivität, aber nur geringe Saure Phosphataseaktivität. Dies kann darauf hindeuten, dass keine Phagozytose von den Epitheloidzellen durchgeführt wurde.

Leider gibt es in der Literatur nur ganz vereinzelte Studien über die Immunreaktion von Fischen auf Myxosporidieninfektionen. Munoz et al. (2000) untersuchten die Reaktion von Phagozyten aus *Dicentrarchus labrax* auf Sporen von *Shaerospora*. Makrophagen aus parasitierten Fischen zeigten einen höheren „respiratory burst“, als Makrophagen aus nicht parasitierten Individuen. Ultrastrukturelle Untersuchungen charakterisierten die meisten Zellen, die Sporen von Myxosporidien phagozytierten als Makrophagen, einige wenige waren Granulozyten. Makrophagen, die Sporen aufgenommen hatten hypertrophierten und zeigten morphologische Veränderungen wie disarrangiertes Zytoplasma und Wanderung von Kern und Organellen zu einem Pol der Zelle. Diese Veränderungen wurden auch von anderen Autoren als Folge von Partikelaufnahme beschrieben (Lamas und Ellis, 1994, Bodammer und Robohm, 1996) und reflektieren den aktiven Status der Makrophagen.

Parasiteninfektionen durch Myxosporidien stellen ein wachsendes Problem für marine Aquakulturen im Mittelmeer dar (Fioravanti et al., 2001). In einer großangelegten Studie untersuchten die Autoren zwischen 1998 und 2000 Parasiteninfektionen in Fischen der Italienischen Mittelmeerküste und fanden Myxobolusinfektionen in Kiemen, Drüsen, Milz und Gallenblase von Mugiliden, mit Ausnahme von *Liza ramada*. Sie fanden eine weite Verbreitung dieser Parasiten in Italienischen Fischfarmen. Auch in anderen Fischarten wurde von Myxobolusinfektionen der Leber berichtet (Cruz et al., 2000: *Chondrostoma polylepis* und *Leuciscus cephalus*). Die Infektionsrate lag in diesen Fällen zwischen 50 und 71%. In einer Süßwasserart in Indien führte die Infektion der Leber mit *Myxobolus sp.* zu einer zystischen Hepatitis (Das et al., 2000). Die Autoren beschrieben die Zysten als stecknadelkopfgroß. In *Mugil cephalus* aus dem Senegal wurden insgesamt 5 verschiedene Myxobolusarten beschrieben, die unter anderem auch die Leber der Fische infizierten (Fall et al., 1997).



Die Infektion mit Myxosporidien führte in der vorliegenden Studie zu einer Stimulierung der Makrophagen, was sich in der Induktion lysosomaler Enzyme, der Zuwanderung weiterer Makrophagen und der Vergößerung der Aggregate äußerte. Diese Parameter waren daher in infizierten Meeräschen nicht mehr als Indikator für Schadstoffeinfluss einsetzbar.

Die auffallendste Veränderung von Enzymaktivitäten in Makrophagen Aggregaten während der Infektion mit *Myxobolus sp.* war die Erniedrigung der G6PDH-Aktivität. Gleichzeitig zeigte die PGDH-Aktivität erhöhte Werte. Dies führte sogar so weit, dass G6PDH und PGDH hochsignifikant negativ miteinander korreliert waren. PGDH und NOS zeigten eine positive Korrelation. In zahlreichen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Parasiten in der Lage waren die Aktivität der NOS herabzusetzen. Eine herabgesetzte NOS-Aktivität hätte auch eine geringere Nachfrage nach NADPH zur Folge, was zu einer Herabsetzung der G6PDH Aktivität führen könnte. Da dies aber im vorliegenden Fall nicht der Fall war, was die erhöhte PGDH-Aktivität zeigte, muss von einem regulativen Einfluss der Parasiten auf die G6PDH-Aktivität ausgegangen werden. PGDH kann bei einer Erniedrigung der G6PDH, das heißt einer geringen Produktion von Phosphogluconat auf diesem Wege, auch über die Umwandlung von Gluconat durch die Gluconatkinase mit ausreichend Substrat versorgt werden, so dass versucht werden kann eine herabgesetzte G6PDH-Aktivität zu kompensieren. Dieser Stoffwechselschritt benötigt allerdings ATP. In Studien an Nierenzellen wurde nachgewiesen, dass eine Hemmung der G6PDH zum Teil dadurch aufgehoben werden konnte, dass Phosphogluconat zur Verfügung gestellt wurde (Farquhar et al., 1968). Die Ergebnisse unserer Arbeit deuten darauf hin, dass die Erniedrigung der G6PDH durch eine Erhöhung der PGHD kompensiert wurde, um die NOS mit NADPH zu versorgen, wie die negative Korrelation zwischen G6PDH und PGDH in infizierten Meeräschen der unbelasteten Station zeigt. Die Aktivität der PGDH war dabei signifikant mit der NOS-Aktivität korreliert. In belasteten Fischen war im Gegensatz dazu die PGDH-Aktivität in MA herabgesetzt, was als einer der deutlichsten immunologischen Marker für toxisch bedingte Effekte in den Mugiliden angesehen werden kann (Kapitel 4). Wie aus dieser Arbeit hervorgeht, können also bestimmte Muster in der G6PDH/PGDH- Aktivität in Makrophagen Aggregaten der Leber von Mugiliden auf unterschiedliche Stressoren Auskunft geben:

	G6PDH	PGDH	NOS
Organochlor	↑↓	↓	↓
Kupfer	↑	→	↓
Parasiten	↓	↑	↑

Was für Auswirkungen eine herabgesetzte G6PDH-Aktivität für den Wirt haben kann, ist intensiv untersucht, da G6PDH Defizienz eine der am weitesten verbreitetsten Enzymanomalien ist. Über 200 Millionen Menschen sind auf der ganzen Welt davon betroffen. Tsai et al. (1998) untersuchten, inwieweit sich G6PDH Defizienz auf die NADPH abhängigen Reaktionen, wie die Produktion von NO und ROS in Granulozyten auswirkt. Sie fanden, dass sowohl die Freisetzung von Stickstoffradikalen, als auch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen im Verlauf der „respiratory burst“ in G6PDH defizienten Granulozyten herabgesetzt waren. Für betroffene Patienten kann dies eine höhere Infektionsanfälligkeit zur Folge haben (Vivez Corrons et al., 1982, Cooper et al., 1972). Die G6PDH Aktivität ist in defizienten Granulozyten auf ein Drittel erniedrigt. In dieser Größenordnung befindet sich auch die daraus folgende Herabsetzung der NOS Aktivität und die Verringerung der NO Freisetzung aus diesen Phagozyten, sowie die ROS Produktion nach Stimulation mit PMA. In der vorliegenden Arbeit konnte in den infizierten Meeräschen der gering belasteten Station eine Herabsetzung der G6PDH-Aktivität auf nahezu 0 in den Makrophagen Aggregaten der

Leber ermittelt werden. In MA von infizierten Meeräschen der belasteten Station war dies nicht der Fall. Die G6PDH Aktivität blieb gegenüber den nicht infizierten Fischen konstant. Es scheint also die belastungsbedingte Erhöhung der G6PDH in MA von Fischen aus der Bucht von Haifa die parasitenbedingte Aktivitätshemmung überzukompensieren. Aber nicht nur Parasiteneinfluss führte zu einer Herabsetzung der G6PDH in MA. Auch in extrem hochbelasteten Fischen wurde eine G6PDH-Inhibition ermittelt.

Die Regulation der G6PDH ist damit für die Funktionsfähigkeit der unspezifischen Immunabwehr extrem wichtig.

Berücksichtigt man neben diesen Untersuchungen auch die oben erwähnten Studien an menschlichen Phagozyten, so kann durchaus spekuliert werden, dass die Herabsetzung der ROS und der iNOS Produktion in Phagozyten durch Schadstoffeinfluss, wie sie in zahlreichen Studien beschrieben worden ist, auf die Suppression der G6PDH Aktivität, zumindest zum Teil zurückzuführen ist.

In den belasteten Fischen aus dem Mittelmeer wurde als eine Reaktion bei mittlerer Belastung eine Erhöhung der G6PDH gemessen. Geht man davon aus, dass auch in Fischen eine so enge Beziehung zwischen Pentose-Phosphat-Zyklus und iNOS/NADPH-Oxidase besteht, so kann diese schadstoffbedingte Induktion der G6PDH durchaus von Vorteil bei der Abwehr von Parasiten sein. Ist das Lebergewebe noch intakt, so ist in der Regel bei PAK-Belastung die Cytochrom P450- Biotransformation induziert, die ebenfalls NADPH benötigt, was durch die Erhöhung der G6PDH Aktivität zur Verfügung gestellt wird. Kommt es aber zu einer Suppression dieser Enzymaktivität, so ist die Immunabwehr empfindlich betroffen und ebenfalls die Biotransformation, das Cytochrom P450- System.

Eine deutliche Suppression der G6PDH konnte in der vorliegenden Studie in Makrophagen gering belasteter Meeräschen nur unter Einfluss von Parasiten ausgemacht werden. So zeigten die infizierten Fische der Infektionsklassen 1 und 2 erheblich geringere G6PDH Aktivität, als die nicht infizierten Fische des selben Standortes. Für die Parasiten bedeutet dies eine größere Chance, sich im Lebergewebe fortpflanzen zu können, da NO/ROS Produktion in Makrophagen herabgesetzt sind. Dies ist die erste Arbeit, die eine Herabsetzung der G6PDH Aktivität in Makrophagen unter Parasiteneinfluss nachgewiesen hat. Weitere Studien sind nötig, um zu untersuchen, inwieweit die Parasiten selbst eine Modulation der Wirts-Enzymaktivität induzieren können. Ist dies der Fall, so kann der Frage nachgegangen werden, auf welche Weise dies den Parasiten möglich ist. Werden eventuell Substanzen sezerniert, die wie Zytokine und Modulatoren die Enzymaktivität der Wirtszellen beeinflussen? Diese Substanzen wären eventuell sogar für eine pharmakologische Nutzung von Interesse, da die G6PDH ein Schlüsselenzym in der Karzinogenese darstellt (Bannasch, 1990, Köhler und Van Noorden, 1998). Die proliferierenden Zellen benötigen sowohl viel NADPH, als auch Pentosen für die DNA Synthese. Eine Herabsetzung der G6PDH-Aktivität hätte eine Verringerung der Proliferation zur Folge.

Die belastungsbedingte Erhöhung der G6PDH, die im Gegensatz zu der Suppression in Fischen aus dem Referenzgebiet steht, kann ein Grund für die in dieser Studie ermittelte geringere Infektionsdichte in belasteten Meeräschen der Bucht von Haifa sein.

Eine weitere Hypothese zur Erklärung der geringen Infektionsrate mit *Myxobolus* in den Lebern belasteter Meeräschen wäre die biozide Wirkung von Radikalen, die im Rahmen der Biotransformation zum Einen direkt aus den metabolisierten Substanzen, zum Anderen durch Radikalkettenreaktionen entstehen.

Schadstoffe, die in den Leberzellen einen Redoxzyklus durchlaufen, werden in diesem Zyklus zu radikalen Metaboliten transformiert, oder tragen zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffmetabolite bei (DiGulio et al., 1989, DiGulio, 1991). Die Biotransformation von

Schadstoffen findet in Vertebraten in erster Linie in der Leber statt. Versucht ein Parasit, sich in der Leber fortzupflanzen, trifft er in belasteten Fischen zwar auf eine herabgesetzte MA-SP Aktivität, aber auf der anderen Seite auch auf eine erhöhte Radikalkonzentration durch "Redox cycling". So wurde zum Beispiel festgestellt, dass Paraquat in Kombination mit Kupfer in einem Umfang freie Radikale erzeugte, dass der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* in vitro in Erythrozyten abgetötet wurde (Marva et al., 1991). Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Untersuchungen von Day et al. (1999). Anhand einer Endothelialzellkultur fanden sie heraus, dass die NOS auch PQ-Diaphoraseaktivität zeigte, das heißt unter Einfluß von Paraquat über den Prozess des „Redoxcycling“ Sauerstoffradikale erzeugte.

## **Makrophagenaggregate und Phylogenese**

Die Betrachtung von Makrophagen Aggregaten unter phylogenetischen Gesichtspunkten hat eine lange Tradition (zusammengefasst von Agius 1980) und fordert jeden Wissenschaftler, der sich mit diesen für Knochenfische typischen Strukturen beschäftigt heraus, sich im Rahmen seiner Arbeiten auch damit zu befassen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass es sich bei Makrophagen in der Leber und ihren Aggregaten um eine Art Vorläufer für die in höheren Vertebraten in der Leber permanent ansässigen Kupfferzellen handeln könnte. Bei der phylogenetischen Verlagerung der MA aus der Leber in Niere und Milz (siehe Einleitung) im Verlauf der Erweiterung der immunologischen Aufgaben dieser Zellen in Fischen, ist die Leber, was die Daueransiedlung von Makrophagen angeht in den Hintergrund gerückt. Phylogenetisch hat sich die Strategie „Makrophagen-Zuwanderung bei Bedarf“, wie sie sich in den höheren Teleostei in der Leber durchgesetzt hatte bei der weiteren Entwicklung nicht bewährt. In einer späteren Stufe wurden wieder permanent ansässige Makrophagen in die Leber der Organismen „eingebaut“- die Kupfferzellen. Diese haben einige Gemeinsamkeiten mit den Makrophagen aus der Leber der Knochenfische.

Die residenten Kupfferzellen stellen in höheren Vertebraten die größte Makrophagenpopulation dar und sind die führende Komponente des Retikuloendothelialen Systems (Wake et al., 1989, Smedsrod et al., 1994, Wardle, 1987). Eine der Hauptfunktionen dieser Zellen ist die Verhinderung systemischer Infektionen durch Radikalproduktion und Phagozytose und das Abtöten von einwandernden Pathogenen (Potoka et al., 1998). Ideal ist für diesen Zweck die strategische Lokalisierung dieser Zellen in den Lebersinusoiden, wo sie das portale Blut von Mikroorganismen und Toxinen reinigen. Unserer Hypothese nach werden in den Teleostei hingegen aus dem Grund mobile Makrophagen benötigt, da eindringende Pathogene nicht nur über den Blutweg zu erwarten sind, sondern insbesondere auch den Weg über die Gallengänge nehmen. Eine Mobililität der Phagozyten ist in diesem Fall also durchaus von Vorteil. Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben verdeutlichte auch die hohe Aktivität der NOS im Gallengangsepithel die Notwendigkeit der Wirtsabwehr auf diesem Infektionsweg.

Dass Makrophagen in der Leber von Fischen ROS erzeugen, wurde in Voruntersuchungen am Steinbutt nachgewiesen (Broeg et al., eingereicht). Dies gilt auch für Kupfferzellen (Potoka et al., 1998). Interessant in diesen Untersuchungen war ausserdem, dass sich die Freisetzung von ROS durch Kupfferzellen erhöhte, wenn sie mit Endothelialzellen gemeinsam kultiviert wurden. Bei höheren Vertebraten scheint es hier also zu einer „Zusammenarbeit“ bei der Abwehr von Pathogenen zu kommen. Ähnliches konnte auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden: Nicht in den Makrophagen direkt, sondern in der endothelialen Hülle die Plasmodien von Myxosporidien umgab, wurden besonders hohe NOS-Aktivitäten festgestellt. Makrophagen Aggregate waren dabei im allgemeinen immer dicht an Endothelien oder Gallengänge assoziiert. Geht man davon aus, dass in der Leber von Fischen im Fall der

Einwanderung von Pathogenen erst eine Anlockung von Makrophagen stattfinden muss, erklärt sich auch die Bildung von Aggregaten. Die „Verzögerung“ durch die zuerst stattfindende Zuwanderung als Antwort auf Krankheitserreger wird dadurch kompensiert, dass die Phagozyten in größerer Menge am Infektionsort auftauchen (siehe Diskussion Granuloma/ Kompensation). Im Fall der residenten Kupfferzellen hingegen kann sofort und ohne Verzögerung gegen den einwandernden Feind vorgegangen werden.

Eine Gemeinsamkeit zwischen der Wirkung von MA und Kupfferzellen ist die potentielle Schädigung des Lebergewebes durch die Aktivität der stimulierten Makrophagen. In der Leber von infizierten Mugiliden aus dem Mittelmeer wurde in dieser Arbeit eine starke Herabsetzung der Lysosomenstabilität in Hepatozyten, insbesondere in den Zellen, die die aktiven Makrophagenzentren umgaben, festgestellt. Die Herabsetzung der Lysosomen Membranstabilität ist ein Marker für Zellschädigungen (Köhler 1991, Köhler et al., 1992). Da dies nur die infizierten Fische betraf, kann davon ausgegangen werden, dass eine aktive Immunantwort von Makrophagen, das heißt Erzeugung von ROS und Freisetzung lysosomaler Enzyme in der Leber dieser Meeräschen die Zellschädigung verursacht hatte.

In der Leber von Ratten wurde ebenfalls eine Erhöhung der Zellschädigung durch den Einfluss von Tetrachlorkohlenstoff beobachtet, wenn diese mit Vitamin A vorbehandelt worden waren. Die Kupfferzellen wurden durch die Wirkung von Vitamin A aktiviert und die Erzeugung von Sauerstoffradikalen hatte zu den Schädigungen, verursacht durch Lipidperoxidation beigetragen (ElSisi et al., 1993). Aktivierte Kupfferzellen setzen viele chemische Mediatoren frei, die für Zellen toxisch sind: Interferone, Interleukine, lysosomale Enzyme, Tumor Nekrosis Faktor und Radikale Sauerstoffmetabolite, um nur einige zu nennen (Nolan, 1981, Laskin, 1990, Decker, 1990).

Über Kupfferzellen in der Leber von Knochenfischen gibt es verschiedene Untersuchungen. Langer (1979) berichtet in seinem Standardwerk über die Leber von Knochenfischen, dass in der sinusoidalen Region der Knochenfische keine Kupfferzellen, wohl aber, in enger Assoziation mit Endothelien Granulozyten zu finden sind. Als einzige Ausnahme fand er bei *Hemihaplochromis multicolor* phagozytierende Endothelzellen. In diese Beschreibung lassen sich auch andere Untersuchungen integrieren, in denen die Autoren wohl von Kupfferzellen sprachen, eine Verbindung zu Makrophagen aber nicht unmittelbar zu finden war. So berichteten Hampton et al. (1987) von residenten sinusoidalen Makrophagen in der Leber von *Ictalurus nebulosus*, die Peroxidase positiv reagierten, was einen enzymatischen Marker für neutrophile Granulozyten darstellt.

Fujita et al. (1980) untersuchten die Sinusoide in der Leber des Goldfisches und fanden wenige Kupfferzellen und Makrophagen, die kleine zytoplasmatische Ausläufer zwischen die Endothelzellen aussandten. Mit ultrastrukturellen Untersuchungen stellten Ferri und Sesso (1981) fest, dass in den Sinusoiden von *Pimelodus maculatus* Kupfferzellen mit Desmosomen an den Endothelialzellen verankert waren. Experimente mit Tinte zeigten, dass sowohl die „Kupfferzellen“, als auch die Endothelialzellen Tinte aufnahmen. Die Autoren mutmaßten daraufhin, dass es sich um zwei unterschiedliche Stadien eines Zelltyps handelt.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass „echte“ Kupfferzellen, vergleichbar der Makrophagenpopulation in Säugetieren in Knochenfischen noch nicht vorhanden sind und dass das phagozytäre System in der Leber von Teleostei mobiler und variabler ist, als das Säugetiersystem. Dies kann aus evolutionärer Sicht nur den Grund haben, dass Knochenfische der „Bedrohung“ durch Krankheitserreger auf verschiedenen Wegen begegnen müssen, was nach Verlassen des Wassers als Lebensraum unter Umständen nicht mehr nötig war.

## Schlussfolgerung

Am Schluss dieser Diskussion steht eine Bewertung zum Einsatz von Leber MA-Funktionen in Rahmen von Biologischen Effektmonitoring Untersuchungen.

Immuntoxikologische Risikoabschätzungen an Nagern und anderen Säugetieren führten zu der Folgerung, dass eine schadstoffbedingte Herabsetzung der angeborenen Immunität einen größeren Einfluß auf die Resistenz gegenüber Pathogenen zur Folge hat, als die Suppression der erworbenen Immunität (Luster et al., 1988). Aus diesem Grund standen die Funktionen der nicht-spezifischen Immunantwort im Zentrum dieser Arbeit.

In internationalen Monitoringprogrammen der Meeres- und Küstenbereiche ist die Überwachung immuntoxikologischer Effekte in Vertebraten wenig bis gar nicht berücksichtigt (ICES 2002). Gerade die Tatsache, dass die Persistent Organic Pollutants (POPs), die in der EU Wasserrahmenrichtlinie eine tragende Rolle spielen, starke immuntoxische Effekte hervorrufen, wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert wurde, muss dazu führen, dass Immuntoxizität innerhalb von Überwachungsprogrammen überprüft wird. Die Aufrechterhaltung der Gesundheit ist nicht nur von individueller Relevanz, sondern ist die Grundlage stabiler Populationen. Ein Grund für das Fehlen immuntoxikologischer Untersuchungen ist sicherlich die diffizile Technik, die nötig ist um Funktionsüberprüfungen an lebenden Immunzellen durchzuführen. Die in dieser Arbeit entwickelten Funktionstests in situ geben Anwendern die Möglichkeit, mit relativ geringem Aufwand und direkter Cryofixierung vor Ort, Untersuchungen über Immunmodulation durchzuführen. Die einfache Kombinierbarkeit mit dem bereits validierten Lysosomenmembranstabilitätstest führt dazu, dass von Laboratorien zwei Tests an einer Leberprobe durchgeführt werden können. Werden die in dieser Arbeit beschriebenen Abhängigkeiten der Makrophagenfunktionen von: Temperatur, Alter, Geschlecht, Reproduktionsstand und Leberinfektion (MA-SP) bei einer Probennahme berücksichtigt, kann sowohl die Aktivität der Sauren Phosphatase, als auch die Aktivität der PGDH, eventuell auch im Zusammenhang mit Größe und Anzahl von MA im Konzert mit anderen Biomarkern für die Abschätzung der Umweltgesundheit empfohlen werden. Wie in der Monitoringstudie der vorliegenden Arbeit beschrieben, stellt die Reaktion der nicht-spezifischen Immunantwort ein wichtiges Bindeglied zwischen frühen Effekten auf subzellulärer und zellulärer Ebene und späten Auswirkungen auf Lebensgemeinschaften dar. In einem EU-Projekt zur Implementierung von Biomarkern in Ostsee, Mittelmeer und Nordostatlantik (BEEP) wird diese Methode momentan weiter auf ihre Anwendbarkeit überprüft.

## Literatur

- Aaltonen, T.M., Jokinen, E.I., Lappivaara, J., Markkula, S.E., Salo, H.M., Leppanen, H., Lammi, R. 2000. Effects of primary- and secondary-treated bleached kraft mill effluents on the immune system and physiological parameters of roach. *Aquat. Toxicol.* 51(1) 55-67.
- Achazi, R.K. 1989. Das Biotransformationssystem der Fische als Schadstoffindikator. *Angewandte Zoologie* 1/89, 1-23.
- Adams, D.O. 1983. The biology of the granuloma. In: *Pathology of granulomas*, ed.: H.L. Ioachim, Raven Press, New York, 1-20.
- Adams, D.O., Hamilton, T.A. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2, 283- 317.
- Adams, D.O. 1976. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am. J. Pathol.* 84, 164-191.
- Adams, S.M., Brown, A.M., Goede, R.W. 1993. A quantitative health assessment index for rapid evaluation of fish condition in the field. *Trans. Am. Fish Soc.* 122(1) 63-73.
- Aderem, A.A., Albert, K.A., Keum, M.M., Wang, J.K., Greengard, P., Cohn, Z.A. 1988. Stimulus-dependent myristylation of a major substrate for protein kinase C. *Nature* 332 (61/62) 362-364.
- Addison, R.F., Zinck, M.E., Smith, T.G. 1986. PCBs have declined more than DDT-group residues in Arctic ringed seals (*Phoca hispida*) between 1972 and 1981. *Environ. Sci. Technol.* 20(3) 253-255.
- Agius, C. 1980. Phylogenetic development of melano- macrophage centers in fish. *J. Zool., Lond.* 191, 11-31.
- Agius, C. 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissues and age-related changes. *Dev. Comp. Immunol.* 5, 597-606.
- Agius, C., Roberts, R.J. 1981. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. *J. Fish Biol.* 19, 161-169.
- Agius, C., Agbede, S.A. 1983. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *J. Fish Biol.* 24, 471-486.
- Ahne, W., Jarre, T. 2002. Environmental toxicology: polychlorinated biphenyls impair TNF- $\alpha$  release in vitro. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 49(2) 105-109.
- Ainsworth, A.J., Dexiang, C., Waterstrat, P.R., Greenway, T. 1991. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Actalurus punctatus*)- I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10°C. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A, 907-912.
- Alcorn, S.W., Murra, A.L., Pascho, R.J. 2002. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunol.* 12(4) 303-34.
- Anderson, D.P., Zeeman, M.G. 1995. Immunotoxicology in fish. In: Rand, G.M. ed., *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, Environmental fate and risk assessment*, 2<sup>nd</sup> Ed., Taylor and Francis, Washington, DC, USA, 371-404.
- Andersson, T., Förlin, L., Härding, J., Larsson, A. 1988. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 45, 1525-1536.
- Arge Elbe 1997. 20 Jahre Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe. *Wassergütestelle Elbe* 23.
- Attrill, M.J., Depledge, M.H. 1997. Community and population indicators of ecosystem health: Targeting links between levels of biological organisation. *Aquat. Toxicol.* 38(1-3) 183-197.
- Attwood, E.M., Weich, D.J., Oosthuizen, J.M. 1996. The influence of carbon particles on the concentration of acid phosphatase and lysozyme enzymes within alveolar macrophages

- during the killing and degradation of *Mycobacterium bovis*. *Tuber. Lung. Dis.* 77(4) 341-347.
- Ayala, A., Fabregat, I., Machado, A. 1990. Possible involvement of NADPH requirement in regulation of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase levels in rat liver. *Mol. Cell Biochem.* 95(2) 107-115.
- Baier-Anderson, C., Anderson, R.S. 1998. Evaluation of the immunotoxicity of chlorothalonil to striped bass phagocytes following in vitro exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(8) 1546-1551.
- Baier-Anderson, C., Anderson, R.S., Haasch, M.L. 2000. Peroxisome proliferating agents, retinoid metabolism, and macrophage activation. *Mar. Environ. Res.* 50, 467.
- Baier-Anderson, C., Anderson, R.S. 2000. Suppression of superoxide production by chlorothalonil in striped bass (*Morone saxatilis*) macrophages: the role of cellular sulfhydryls and oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 50, 85-96.
- Bannasch, P. 1990. Pathobiology of chemical hepatocarcinogenesis: recent progress and perspectives. Part II. Metabolic and molecular changes. *J Gastroenterol. Hepatol.* 5(3) 310-320.
- Benedetti, A., Comporti, M., Esterbauer, H. 1980. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 620(2) 281-296.
- Bennani, N., Schmid-Alliana, A., Lafauri, M. 1995. Evaluation of phagocytic activity in teleost fish, *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 237-243.
- Bennani, N., Schmid-Alliana, A., Lafauri, M. 1996. Immunotoxic effects of copper and cadmium in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 18, 129-144.
- Beutler, E. 1990. Hematology. W.J. Williams, E. Beutler, A. Erslev, M.A. Lichtman, eds., McGraw Hill Publishing Co., New York, 591-726.
- Bianco, C., Eden, A., Cohn, Z.A. 1976. The induction of macrophage spreading: role of coagulation factors and the complement system. *J. exp. Med.* 144, 1531-1544.
- Bitensky, L., Butcher, R.S., Chayen, J. 1973. Quantitative cytochemistry in the study of lysosomal function. In: *Lysosomes in biology and pathology*, vol. 3. Ed.: J.T. Dingle. Amsterdam, Oxford, New York, Elsevier, 465-510.
- Bjoerk, M., Gilek, M. 1999. Efficiencies of polychlorinated biphenyl assimilation from water and algal food by the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18(4) 765-771.
- Black, C.M., Beaman, B.L., Donovan, R.M., Goldstein, E. 1983. Effect of virulent and less virulent strains of *Nocardia asteroides* on acid phosphatase activity in alveolar and peritoneal macrophages maintained in vitro. *J. Infect. Dis.* 148, 117-124.
- Blazer, V.S., Wolke, R.E., Brown, J., Powell, C.A. 1987. Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors- effect of age, sex, relative weight, season and site quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquat. Toxicol.* 10, 199-215.
- Bly, J.E., Clem, L.W. 1991. Temperature-mediated processes in teleost immunity: in vitro immunosuppression induced by in vivo low temperature in channel catfish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28, 365-377.
- Bly, J.E., Clem, L.W. 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* 2 (3) 159-171.
- Bodammer, J.E., Robohm, R.A. 1996. Ultrastructural observations on the phagocytic behaviour of winter flounder *Pleuronectes americanus* peritoneal neutrophils and macrophages in vivo. *Dis. Aquat. Org.* 25, 197-208.
- Boll, M., Weber, L.W., Stampfl, A., Messner, B. 1994. Lipogenic enzymes of rat liver and adipose tissue. Dietary variations and effect of polychlorinated biphenyls. *Z. Naturforsch.* 49(9-10) 665-678.

- Boll, M., Weber, L.W., Messner, B., Stampfl, A. 1998. Polychlorinated biphenyls affect the activities of gluconeogenic and lipogenic enzymes in rat liver: is there an interference with regulatory hormone actions? *Xenobiotica* 28(5) 479-492.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E.J. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25(8-9) 853-873.
- Bouley, D.M., Ghori, N., Mercer, K.L., Falkow, S., Ramakrishnan, L. 2001. Dynamic nature of host-pathogen interactions in *Mycobacterium marinum* granulomas. *Infect. Immun.* 69(12) 7820-7831.
- Broeg, K., Köhler, A., von Westernhagen, H. 2002. Disorder and recovery of environmental health monitored by means of lysosomal stability in the liver of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Mar. Environ. Res.*, in press.
- Broeg, K., Krüner, G., Köhler, A. Non-specific immune response, CYP450 induction and membrane stability of lysosomes in the liver of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) are modulated by chlorinated hydrocarbons. *Fish Shellfish Immunol.*, submitted.
- Broeg, K., Zander, S., Diamant, A., Körting, W., Krüner, G., Paperna, I., Westernhagen, H. v. 1999. The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring I. North Sea. *Helgoland Mar. Res.*, 53, 171-194.
- Brown, C.L., George, C.J. 1985. Age-dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill). *J. Fish Dis.* 8, 135-138.
- Bryant, C., Behm, C. 1989. *Biochemical adaptation in parasites.* Chapman and Hall, London, New York.
- Bucheli, T.D., Fent, K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech.* 25, 201-268.
- Buchwald, S.L., Saini, M.S., Knowles, J.R., Van Etten, R.L. 1984. Stereochemical course of phospho group transfer by human prostatic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 259, 2208-2213.
- Bucke, D., Dixon, P.F., Feist, S.W. 1989. The measurement of disease susceptibility in dab *Limanda limanda* L. following long term exposure to contaminated sediments: preliminary studies. *Mar. Environ. Res.* 28, 363-367.
- Buko, V.U., Artsukevich, A.A., Ignatenko, V. 1999. Aldehydic products of lipid peroxidation inactivate cytochrome p-450. *Exp. Toxic. Pathol.*, 51, 294-298.
- Bunton, T.E., Baksi, S.M., George, S.G., Frazier, J.M. 1987. Abnormal hepatic copper storage in a teleost fish (*Morone americana*). *Vet. Pathol.* 24, 515-524.
- Burke, M.D., Mayer, R.T. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methyl-cholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* 2, 583-588.
- Cairns jr., J. 1991. Will integrative science develop with sufficient rapidity to mitigate global environmental degradation? *Speculations in Science and Technology* 15(1) 54-59.
- Campos-Perez, J.J., Ellis, A.E., Secombes, C.J. 2000. Toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to bacterial pathogens of fish. *Dis. Aquat. Org.* 43, 109-115.
- Cannon, J.G., St. Pierre, B.A. 1997. Gender differences in host defense mechanisms. *J Psychiatr. Res.* 31(1) 99-113.
- Carreras, M.C., Pargament, G.A., Catz, S.D., Poderoso, J.J., Boveris, A. 1994. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.* 341(1) 65-68.
- Celander, M. 1993 Induction of cytochrome P450 in teleost fish with emphasis on the CYP1 gene family. Academic thesis, University of Gotenborg, Sweden.
- Chao, T.C., Van Alten, P.J., Walter, R.J. 1994. Steroid sex hormones and macrophage function: modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release. *Am. J. Reprod. Immunol.* 32(1) 43-52.



- Chen, C.-H., Chen, S.C. 1988. Evidence of acid phosphatase in the cytoplasm as a distinct entirety. *Arch. Biochem. Biophys.* 262, 427-438.
- Chen, D., Ainsworth, A.J. 1991. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). 2. Adaptation of anterior kidney phagocytes to 10 degree C. *Comp. Biochem. Physiol. A* 100A (4), 913-918.
- Chen, T.Y., Lei, M.G., Suzuki, T., Morrison, D.C. 1992. Lipopolysaccharide receptors and signal transduction pathways in mononuclear phagocytes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181, 169-188.
- Chieco, P., Normanni, P., Moslen, M.T. 1988. Localization of high benzaldehyde dehydrogenase activity in rat upper gastrointestinal tract mucosa: a quantitative histochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 36(3) 245-52.
- Chieco, P., Jonker, A., Melchiorri, C., Vanni, G., Van Noorden, C.J.F. 1994. A user's guide for avoiding errors in absorbance image cytometry: a review with original experimental observations. *Histochem. J.*, 26, 1-19.
- Chung, S., Secombes, C.J. 1987. Activation of rainbow trout macrophages. *J. Fish Biol.* 31 (A), 51-56.
- Clark, I.A., Rockett, K.A. 1996. Nitric oxide and parasitic disease. *Adv. Parasitol.* 37, 1-56.
- Cohen, S., Warren, K.S. 1982. *Immunology of parasitic infections*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Cohn, Z.A. 1968. The structure and function of monocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* 9, 163-214.
- Connell, D.W., Chaisuksant, Y., Yu, J. 1999. Importance of internal biotic concentrations in risk evaluations with aquatic systems. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 54-61.
- Cooper, M.R., DeChatelet, L.R., McCall, C.E., LaVia, M.F., Spurr, C.L., Baehner, R.L. 1972. Complete deficiency of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase with defective bactericidal activity. *J Clin. Invest.* 51(4) 769-778.
- Cooper, J.A., Chapleau, F. 1998. Monophyly and intrarelations of the family Pleuronectidae (Pleuronectiformes), with a revised classification. *Fish. Bull.* 96(4) 686-726.
- Costa Rosa, L.F., Curi, R., Murphy, C., Newsholme, P. 1995. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O<sub>2</sub> metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADP<sup>+</sup>-dependent 'malic' enzyme. *Biochem. J.* 310(2) 709-14.
- Couch, J.A. 1975. Histopathological effects of pesticides and related chemicals on the livers of fish. In: Ribelin, W.E., Migaki, G. (eds.) *The pathology of fish*. Univ. Wisconsin Press, Madison 559-584.
- Cramer, C.T., Cooke, S., Ginsberg, L.C., Kletzin, R.F., Stapleton, S.R., Ulrich, R.G. 1995. Upregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in response to hepatocellular oxidative stress: Studies with diquat. *J. Biochem. Toxicol.* 10(6) 293-298.
- Crespo, S., Grau, A., Padros, F. 1994. The intensive culture of 0-group amberjack in the western Mediterranean is compromised by disease problems. *Aquacult. Int.* 2(4) 262-265.
- Cross, M.L., Qureshi, T., Mackintosh, C.G. 1999. Oxidative responses in ferret macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 171-184.
- Cruz, C., Saraiva, A., Ferreira, S. 2000. Preliminary observations on *Myxobolus* sp. from cyprinid fish in Portugal. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 20(2) 65-69.
- Curnutte, J.T., Erickson, R.P., Ding, J., Badwey, J.A. 1994. Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with phorbol ester. *J.Biol.Chem.* 269, 10813-10819.

- Curnutte, J.T., Whitten, D.M., Babior, B.M. 1976. Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* 290, 593-597.
- Dagher, M.C., Fuchs, A., Bourmeyster, N., Jouan, A., Vignais, P.V. 1995. Small G proteins and the neutrophil NADPH oxidase. *Biochimie* 77(7-8) 651-660.
- Dalal, D., Bhattacharya, S. 1994. Effect of cadmium, mercury, and zinc on hepatic microsomal enzymes of *Channa punctatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 893-901.
- Dalela, R.C., Rani, S., Verma, S.R. 1980. Physiological stress induced by sublethal concentrations of phenol and pentachlorophenol in *Notopterus notopterus*: hepatic acid and alkaline phosphatases and succinic dehydrogenase. *Environ. Pollut.* 21A(1) 3-8.
- Daniel, V., Huber, W., Bauer, K., Suesal, C., Conradt, C., Opelz, G. 2001. Associations of blood levels of PCB, HCHs, and HCB with numbers of lymphocyte subpopulations, in vitro lymphocyte response, plasma cytokine levels, and immunoglobulin autoantibodies. *Environ. Health Perspect.* 109(2) 173-178.
- Das, B.K., Mukherjee, S.C., Murjani, G. 2000. Histopathological studies on the myxoboliasis of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton-Buchanan). *Indian J. Fish* 47(1) 61-64.
- Day, B.J., Patel, M., Calavetta, L., Chang, L.Y., Stamler, J.S. 1999. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(22) 12760-12765.
- De Araujo, P.S., Mies, Y., Miranda, O. 1976. Subcellular distribution of low- and high-molecular weight acid phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* 452, 121-130.
- De Jong, F., Bakker, J., van Berkel, C., Dahl, K., Dankers, N., Gätje, C., Marencic, H., Potel, P. 1999. Wadden Sea Quality Status Report. Wadden Sea Ecosystem No. 9. Common Wadden Sea Secretariat, Trilateral Monitoring and Assessment Group, Quality Status Report Group. Wilhelmshaven, Germany.
- Decker, K. 1990. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.* 192, 245-261.
- De Duve, C., Wattiaux, R. 1966. Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* 28, 435-492.
- Den Besten, P.J. 1998. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. *Mar. Environ. Res.* 46, 253-256.
- Depledge, M.H., Agard, A., Györkos, P. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular physiological and behavioural biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 19-27.
- Dewailly, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Gingras, S., Belles-Isles, M., Roy, R. 2000. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environ. Health Perspect.* 108(3) 205-211.
- Diamant, A., Banet, A., Paperna, I., v. Westernhagen, H., Broeg, K., Krüner, G., Körting, W., Zander, S. 1999. The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring II. The Red Sea and Mediterranean. *Helgol. Mar. Res.* 53, 195-208.
- Dhavale, D.M., Masurakar, V.B. 1986. Effect of cadmium exposure on the activity of phosphatases in the hepatopancreas of crab *Scylla serrata* (Forsk.). *Indian J. Mar. Sci.* 15(3) 193-194.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.T., Winston, G.A., Jewell, C.S. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.
- Di Giulio, R.T. 1991. Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination. *Aquat. Toxicol. Risk Assess.* 15-31.
- Didier, E.S. 1995. Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunol.* 17 (8) 405-412.
- Didier, E.S., Varner, P.W., Didier, P.J., Aldras, A.M., Millichamp, N.J., Murphey-Corb, M., Bohm, R., Shaddock, J.A. 1994. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol. (Praha)* 41(1) 1-11.

- Drewa, G., Dabrowska, T., Zbytniewski, Z., Patuch, F. 1979. Effect of crude oil and detergent SOLO on the activity of some hydrolases in the hemolymph of crab *Rhithropanopeus harrisi*. Pol. Arch. Hydrobiol. 26(1-2) 205-211.
- Dubale, M.S., Shah, P. 1981. Biochemical alterations induced by cadmium in the liver of *Channa punctatus*. Environ. Res. 26(1) 110-118.
- Dunier, M., Siwicki, A.K. 1993. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. Fish Shellfish Immunol. 3, 423-438.
- Dykova, I. 1984. The role of melanomacrophage centres in the tissue reaction to myxosporean infections of fishes. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 65-67.
- Dykova, I. 1995. Fish diseases and disorders. Vol. 1, Protozoan and metazoan infections. Ed.: P.T.K. Wo, CAB International, Wallingford.
- Eggeleston, L.V., Krebs, H.A. 1974. Regulation of the pentose phosphate cycle. Biochem. J., 138, 425-435.
- Ellis, A.E., Sousa, M.A.B. 1974. Phylogeny of the lymphoid system. I. A study of the fate of circulating lymphocytes in the plaice. Europ. J. Immunol. 4, 338-343.
- Ellis, A.E., Munroe, A.L.S., Roberts, R.J. 1976. A study of the phagocytic system and the fate of interperitoneally injected particulate material in plaice (*Pleuronectes platessa* L.). J. Fish Biol. 8, 67-78
- Ellis, A.E. 1978. The immunology of teleosts. In: Fish Pathology. Ed.: R.J. Roberts, Bailliere Tindall, London, 92-104.
- Ellis, A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol. 25(8-9) 827-839.
- ElSisi, A.E., Earnest, D.L., Sipes, I.G. 1993. Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: role of liver macrophages and active oxygen species. Toxicol. Appl. Pharmacol. 119(2) 295-301.
- Enane, A.E., Bowser, D., Frenkel, K., Squibb, K.S., Zelikoff, J.T. 1991. Fish immune response, a biomarker for detecting the effect of cadmium exposure. Pro. Soc. Environ. Toxicol. Chem. 12, 187-195.
- Enane, N.A., Frenkel, K., O'Connor, J.M., Squibb, K.S., Zelikoff, J.T. 1993. Biological markers of macrophage activation: application for fish phagocytes. Immunology, 80, 68-72.
- Fall, M., Kpatcha, K.P., Diebakate, C., Faye, N., Toguebaye, B.S. 1997. Observations of myxosporidia (Myxozoa) of the genus myxobolus parasites of *Mugil cephalus* (Pisces, Teleostei) from Senegal. Parasite 4(2) 173-180.
- Farquhar, J.K., Scott, W.N., Coe, F.L. 1968. Hexose monophosphate shunt activity in compensatory renal hypertrophy. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129(3) 809-812.
- Fatima, M., Ahmad, I., Siddiqui, R., Raisuddin, S. 2001. Paper and pulp mill effluent-induced immunotoxicity in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40(2) 271-276.
- Ferri, S., Sesso, A. 1981. Ultrastructural study of Kupffer cells in teleost liver under normal and experimental conditions. Cell Tissue Res. 220(2) 387-391.
- Fioravanti, M.L., Caffara, M., Delgado, M.L., Florio, D., Marcer, F., Quaglio, F., Resant, R. 2001. Survey on the diffusion of myxosporeans (Myxozoa) in marine fish farmed in Italy. Note I. Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica 13(22) 12-25.
- Fletcher, T.C. 1982. Non-specific defence mechanisms of fish. Dev. Comp. Immunol. 2, 123-132.
- Fletcher, CL., McKay, WA. 1993. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in the aquatic environment-a literature review. Chemosphere 26(6) 1041-1069.

- Forman, L.J., Liu, P., Nagele, R.G., Yin, K., Wong, P.Y. 1998. Augmentation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurochem Res.* 23(2) 141-8.
- Fournie, J.W., Summers, J.K., Courtney, L.A., Engle, V.D., Blazer, V.S. 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *J. Aquat. Anim. Health* 13, 105-116.
- Fujita, H., Tamaru, T., Miyagawa, J. 1980. Fine structural characteristics of the hepatic sinusoidal walls of the goldfish (*Carassius auratus*). *Arch. Histol. Jpn.* 43(3) 265-273.
- Gilbert, N.L., Cloutier, M.-J., Spear, P.A. 1995. Retinoic acid hydroxylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the effect of a coplanar PCB, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Aquat. Toxicol.* 32, 177-187.
- Goeptar, A.R., Scheerens, H., Vermeulen, N.P. 1995. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.* 25(1) 25-65.
- Goerke, H., Weber, K. 2001. Species-specific elimination of polychlorinated biphenyls in estuarine animals and its impact on residue patterns. *Mar. Environ. Res.* 51(2) 131-149.
- Goksoyr, A., Beyer, J., Egaas, E., Grosvik, B.E., Hylland, K., Sandvik, M., Skaare, J.U. 1996. Biomarker response in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 33(1-6) 36-45.
- Graham, S., Jeffries, A.H., Secombes, C.J. 1988. A novel assay to detect macrophage bactericidal activity in fish: Factors influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.* 11, 389-396.
- Granger, D.L. 1991. Macrophage production of nitrogen oxides in host defence against microorganisms. *Res. Immunol.* 142(7) 570-572.
- Grinwis, G.C.M., Boonstra, A., van den Brandhof, E.-J., Dormans, J.A.M.A., Engelsma, M., Kuiper, R.V., van Loveren, H., Wester, P.W., Vaal, M.A., Vethaak, A.D., Vos, J.G. 1998. Short-term toxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide in flounder (*Platichthys flesus*): Pathology and immune function. *Aquat. Toxicol.* 42, 15-36.
- Guiney, P.D., Melancon, M.J. Jr., Lech, J.J., Peterson, R.E. 1979. Effects of egg and sperm maturation and spawning on the distribution and elimination of a polychlorinated biphenyl in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 47(2) 261-272.
- Gupta, A.K., Rajbanshi, V.K. 1985. Histochemical study on the toxicity of copper and cadmium in the liver and kidney of *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Int. J. Acad. Ichthyol.* 6(1-2) 5-10.
- Gupta, P.K., Sastry, K.V. 1981. Effect of mercuric chloride on enzyme activities in the digestive system and chemical composition of liver and muscles of the catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 5(4) 389-400.
- Gupta, S. 1987. Physiological stress induced by sublethal concentrations of phenolic compounds in *Notopterus notopterus*: Measurement of hydrolytic enzymes. *Environ. Res.* 42(2) 304-311.
- Haaparanta, A., Valtonen, E.T., Hoffmann, R., Holmes, J. 1996. Do macrophage centres in freshwater fishes reflect the differences in water quality? *Aquat. Toxicol.* 34, 253-272.
- Hampton, J.A., Klaunig, J.E., Goldblatt, P.J. 1987. Resident sinusoidal macrophages in the liver of the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*): an ultrastructural, functional and cytochemical study. *Anat. Rec.* 219(4) 338-346.
- Hard, G.C. 1970. Some biochemical aspects of the immune macrophage. *Br. J. exp. Path.* 51, 97-105.
- Hardie, L.J., Chappell, L.H., Secombes, C.J. 1994. Human tumor necrosis factor alpha influences rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leukocyte responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40(1) 73-48.

- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., Secombes, C.J. 1994. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 18 (1) 57-66.
- Hargrave, B.T., Bodungen, B. von, Conover, R.J., Fraser, A.J., Phillips, G., Vass, W.P. 1988. Seasonal changes in sedimentation of particulate matter and lipid content of zooplankton collected by sediment trap in the Arctic Ocean off Axel Heiberg Island. *Polar Biology.* Berlin, Heidelberg 9, 467-475.
- Harvey, W.K., Lindahl, R. 1982. Activity of various aldehyde-metabolizing enzymes in chemically-induced rat hepatomas. *Biochem. Pharmacol.* 31(6) 1153-5.
- Hayman, J.R., Bly, J.E., Levine, R.P., Lobb, C.J. 1992. Complement deficiencies in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) associated with temperature and seasonal mortality
- Herut, B., Kress, N., Shefer, E., Hornung, H. 1999. Trace element levels in mollusks from clean and polluted coastal marine sites in the Mediterranean, Red and North Sea. *Helgol. Mar. Res.* 53, 154-162.
- Heyworth, P.G., Badwey, J.A. 1990. Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22, 1-26.
- Hinton, D.E., Koenig, J.C. jr. 1975. Acid phosphatase activity in subcellular fractions of fish liver exposed to methyl mercuric chloride. *Comp. Biochem. Physiol. B* 50(4) 621-625.
- Hooghe, R.J., Devon, S., Hooghe-Peters, E.L. 2000. Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sciences* 66(26) 2519-2525.
- Hornung, H., Kress, N. 1991. Trace metals in offshore and inshore fish from the Mediterranean coast of Israel. *Toxicol. Environ. Chem.* 31/32, 135-145.
- Hovinga, M.E., Sowers, M., Humphrey, H.E.B. 1993. Environmental exposure and lifestyle predictors of lead, cadmium, and DDT levels in Great Lakes fish eaters. *Arch. Environ. Health* 48(2) 98-104.
- Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. 1992. Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. In SETAC special publication series, C.H. Ward, B.T. Walton, T.W. LaPoint, Lewis Publishers, Boca Raton.
- Hyman, M.R., Arp, D.J. 1991. Kinetic analysis of the interaction of nitric oxide with the membrane associated, nickel and iron-sulphur containing hydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1076, 165-172.
- ICES, 1996. Report of the working group on biological effects of contaminants. ICES CM 1996/ENV:5.
- ICES, 2002. Report of the working group on biological effects of contaminants. ICES CM 2002/E:02.
- Ikejima, K., Enomoto, N., Imuro, Y., Ikejima, A., Fang, D., Xu, J., Forman, D.T., Brenner, D.A., Thurman, R.G. 1998. Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am. J. Physiol.* 274(4) 669-76.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Beckman, J.S. 1992. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 298(2) 446-51.
- Iwama, G., Hakanishi, I. 1996. *The fish immune system: Organism, Pathogen and Environment*, Academic Press, San Diego, USA.
- Jaffrey, S.R., Snyder, S.H. 1996. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* 274, 774-776.
- James, S.L. 1995. Role of nitric oxide in parasite infections. *Microbiol. Rev.* 59, 533-547.
- Jang, S.I., Hardie, L.J., Secombes, C.J. 1995. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. *J. Leukocyte Biol.* 57(6) 943-947.

- Janska, H., Kubicz, A. 1985. Studies on the heterogeneity of carp liver acid phosphatases: acid phosphatase. I. Subunit structure and carbohydrate composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B, 563-567.
- Johnson, G.W., Jarman, W.M., Bacon, C.E., Davis, J.A., Ehrlich, R., Risebrough, R.W. 2000. Resolving Polychlorinated Biphenyl Source Fingerprints in Suspended Particulate Matter of San Francisco Bay.
- Jones, T.C., Hirsch, J.G. 1972. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* 136, 1173-1194.
- Jorens, P.G., Matthys, K.E., Bult, H. 1995. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators of Inflammation* 4, 75-89.
- Khan, M.A.Q., Korte, F., Payne, J.F. 1979. Metabolism of pesticides by aquatic animals. In: *Pesticide and Xenobiotic Metabolism in Aquatic Organisms*. Eds.: M.A.Q. Khan, J.J. Lech, J.J. Menn, ASC, Washington, D.C. 191-219.
- Khengarot, B.S., Tripathi, D.M. 1991. Changes in humoral and cell-mediated immune responses and in skin and respiratory surfaces of catfish, *Saccobranchus fossilis*, following copper exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22, 291-308.
- Klein, J. 1991. *Immunologie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel.
- Kletz, R.F., Harris, P.K.W., Foelimi, L.A. 1994. Glucose-6-phosphat dehydrogenase: a „housekeeping“ enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.* 8, 174-181.
- Köhler, A. 1989. Experimental studies on the regeneration of contaminant induced liver lesions in flounder from the Elbe estuary- steps towards the identification of cause-effect relationships. *Aquat. Toxicol.* 14, 203-232.
- Köhler, A. 1990. Identification of contaminant- induced cellular and subcellular lesions in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) caught at differently polluted estuaries. *Aquat. Toxicol.* 16, 271-294.
- Köhler, A. 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 C,1/2, 123-127.
- Köhler, A., Deisemann, H., Lauritzen, B. 1992. Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91, 141-153.
- Köhler, A., Pluta, H.-J. 1995. Lysosomal injury and MFO activity in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and carcinogenesis. *Mar. Environ. Res.* 39, 255-260.
- Köhler, A., Lauritzen, B., Jansen, D., Böttcher, P., Tegoliwa, L., Krüner, G., Broeg, K. 1998. Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Carcinus maenas* hepatopancreas by immuno-gold-silver labeling, *Mar. Environ. Res.* 46(1-5) 411-414.
- Koehler, A., Van Noorden, C.J.F.(1998). Initial velocities in situ of G6PDH and PGDH and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): sensitive diagnostic markers of environmentally induced hepatocellular carcinogenesis in a marine flatfish (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.* 40, 233-252.
- Köhler, A., Wahl, E., Söffker, K. 2002. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* In press.
- Kranz, H., Peters, N. 1984. Melano-macrophage centres in liver and spleen of ruffe (*Gymnocephalus cernua*) from the Elbe estuary. *Helgoländer Meeresunters.* 37, 415-424.
- Kranz, H. 1989. Changes in splenic melano-macrophage centres of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. *Dis. aquat. Org.* 6, 167-173.
- Kranz, H., Gercken, J. 1987. Effects of sublethal concentrations of potassium dichromate on the occurrence of splenic melano-macrophage centres in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa*, L. *J. Fish Biol.* 31 (A) 75-80.

- Krause, K.-H., Clark, R.A., Wyman, M.P. 1997. European workshop on the cell biology of phagocytes. *J. Leukocyte Biol.* 61, 1-5.
- Kress, N., Herut, B., Shefer, E., Hornung, H. 1999. Trace element levels in fish from clean and polluted coastal marine sites in the Mediterranean Sea, Red Sea and North Sea. *Helgol. Mar. Res.* 53, 163-170.
- Krieger, J.A., Born, J.L., Burchiel, S.W. 1994. Persistence of calcium elevation in the HPB-ALL human T cell line correlates with immunosuppressive properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 268-274.
- Kröncke, K.-D., Kolb-Bachofen, V., Berschick, B., Burkart, V., Kolb, H. 1991. Activated macrophages kill pancreatic syngenic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 752-758.
- Kröncke, K.-D., Fehsel, K., Suschek, C., Kolb-Bachofen, V. 2001. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1407-1420.
- Kudo, R.R. 1919. Studies on Myxosporidia. III. *Biol. Monogr.* 5, 241-503.
- Lakshmi, R., Kundu, R., Thomas, E., Mansuri, A.P. 1991. Mercuric chloride induced inhibition of acid phosphatase activity in the kidney of mudskipper, *Boleophthalmus dentatus*. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 19(3) 341-344.
- Lamas, J., Ellis, A.E. 1994. Electron microscopic observations of the phagocytosis and subsequent fate of *Aeromonis salmonicida* by Atlantic salmon neutrophils in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 539-546.
- Landwüst, C., Anders, K., Holst, S. et al. 1996. Fischkrankheiten in der Nordsee. Umweltbundesamt Texte 57/96 ISSN 0722-186X, 1-557.
- Langer, M. 1979. Histologische Studien der Teleosteer Leber. II. Das Blutgefäßsystem. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 93(5) 849-875.
- Larsson, A., Bengtsson, B.-E., Haux, C. 1981. Distributed ion balance in flounder, *Platichthys flesus* L. exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat. Toxicol.* 36, 119-127.
- Laskin, D.L., 1990. Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin. Liver Dis.* 10(4) 293-304.
- Leiro, J., Iglesias, R., Parama, A., Sanmartin, M.L., Ubeira, F.M. 2001. Respiratory burst responses of rat macrophages to microsporidian spores. *Experimental Parasitology* 98, 1-9.
- Leiro, J., Iglesias, R., Parama, A., Sanmartin, M.L., Ubeira, F.M. 2001. Effect of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) infection on respiratory-burst responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 639-652.
- Leiro, J., Ortega, M., Sanmartin, M.L., Ubeira, F.M. 2000. Non-specific responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) adherent cells to microsporidian spores. 2000. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 75, 81-95.
- Li, H., Hu, J., Xin, W., Zhao, B. 2000. Production and interaction of oxygen and nitric oxide free radicals in PMA stimulated macrophages during the respiratory burst. *Redox. Rep.* 5(6) 353-8.
- Liew, F.Y. 1993. The role of nitric oxide in parasitic diseases. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 87(6) 637-42.
- Lindahl, R. 1982. Induction of aldehyde dehydrogenases during hepatocarcinogenesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 114, 121-35.
- Lojda, Z., Gossrau, R., Schiebler, T.H. 1979. Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Springer Verlag, New York.
- Lom, J., Dykova, I. 1992. Protozoan parasites of fishes. *Developments in aquaculture and fisheries sciences vol. 26.* Elsevier Sci. Publ. B.V. Amsterdam.
- Lowrie, D.B., Jackett, P.S., Andrew, P.W. 1985. Activation of macrophages for antimycobacterial activity. *Immunol. Lett.* 11, 195-203.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luebke, R.W., Hodson, P.V., Faisal, M., Ross, P.S., Grasman, K.A., Zelikoff, J. 1997. Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundam. Appl. Toxicol.* 37(1) 1-15.
- Luster, M. I., Munson, A.E., Thomas, P.T., Holsapple, M.P., Fenters, J. D., White, K.L., Lauer, L.D., Germolec, D.R., Rosenthal, G.J., Dean, J.H. 1988. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National toxicology programs guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 10, 2-19.
- Macchi, G.J., Romano, L.A., Christiansen, H.E. 1992. Melano-macrophage centres in whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri*, as biological indicators of environmental changes. *J. Fish Biol.* 40, 971-973.
- Machala, M., Drabek, P., Neca, J., Kolaova, J., Svobodova, Z. 1998. Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver. *Ecotox. Environ. Saf.* 41(1) 107-111.
- Malins, D.C., McCain, B.B., Brown, D.W., Chan, S.L., Myers, M.S., Landahl, J.T., Prohaska, P.G., Friedmann, A.J., Rhodes, L.D., Burrows, D.G., Gronlund, W.D., Hodgins, H.O. 1984. Chemical pollutants in sediments and disease of bottom-dwelling fish in Pudget Sound, Washington. *Environ. Sci. Technol.* 18, 705-713.
- Marletta, M.A. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78, 927-930.
- Marty, G.D., Okihiro, M.S., Brown, E.D., Hanes, D., Hinton, D.E. 1999. Histopathology of adult herring in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Can. J. Aquat. Sci.* 56 (3) 419-426.
- Marva, E., Chevion, M., Golenser, J. 1991. The effect of free radicals induced by paraquat and copper on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13(1) 137-146.
- Mathur, A.K., Gupta, B.N., Garwal, C.A. Arora, S., Singh, A. 1990. Effects of linear alkylbenzene sulphonat on fish: An in vivo study. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 37(3) 413-418.
- Mauël, J. 1982. In vitro induction of intracellular killing of parasitic Protozoa by macrophages. *Immunobiology* 161, 392-400.
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R. 1990. Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers, Boca Raton.
- McPhail, L.C., Qualliotine-Mann, D., Agwu, D.E., McCall, C.E. 1993. Phospholipases and activation of NADPH-Oxidase. *Eur. J. Haematol.* 51, 294-300.
- Mehendale, H.M. 1992. Biochemical mechanisms of biphasic dose-response relationships: Role of hormesis. In Calabrese, E.J., ed. *Biological effects of low level exposures to chemicals and radiation*, Lewis, Boca Raton, FL, USA, 59-94.
- Mercier, M., Pascal, G., Azais-Braesco, V. 1990. Retinyl ester hydrolase and vitamin A status in rats treated with 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Biochim. Biophys. Acta* 1047, 70-76.
- Mochitate, K., Ishida, K., Ohsumi, T., Miura, T. 1992. Long-term effects of ozone and nitrogen dioxide on the metabolism and population of alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health.* 35(4) 247-60.
- Moore, M.N. 1980. Cytochemical determination of cellular responses to environmental stressors in marine organisms. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer.* 179, 7-15.
- Moore, M. N., Widdows, J., Cleary, J.J., Pipe, R.K. 1984. Response of the common mussel *Mytilus edulis* to copper and phenanthren: interactive affects. *Mar. Environ. Res.* 14, 167-183.
- Moore M. N. 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.* 16, 134 - 139.



- Mori, M. 1980. Studies on the phagocytic system in goldfish- I. phagocytosis of intraperitoneally injected carbon particles. *Fish Pathology* 15 (1) 25-30.
- Muir, D.C.G., Ford, C.A., Grift, N.P., Stewart, R.E.A., Bidleman, T.F. 1992. Organochlorine contaminants in narwhal (*Monodon monoceros*) from the Canadian Arctic. *Environ. Pollut.* 75(3) 307-316.
- Mulero, V., Meseguer, J. 1998. Functional characterization of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 8(2) 143-156.
- Munho, B.J., Davila, D.R., Burchiel, S.W. 1997. Characterisation of intracellular calcium responses produced by polycyclic aromatic hydrocarbons in surface marker-defined human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 323-330.
- Munoz, P., Alvarez-Pellitero, P., Sitja-Bobadilla, A. 2000. Modulation of the in vitro activity of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by the myxosporean parasite *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporae: Bivalvulida). *Fish Shellfish Immunol.* 10, 567-581.
- Murchelano, R.A., Wolke, R.E. 1991. Neoplasms and nonneoplastic liver lesions in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts. *Environ. Health Perspect.* 90, 17-26.
- Mushiak, K., Nakai, T., Mugora, K. 1985. Lowered phagocytosis in the blood of eels exposed to copper. *Fish Pathol.* 20(1) 49-57.
- Muus, B., Dahlström, P. 1978. Meeresfische der Ostsee, der Nordsee, des Atlantiks. BLV Verlagsgesellschaft, München. 244 p.
- Myers, M.S., Rhodes, L.D., McCain, B.B. 1987. Pathological anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions and other idiopathic hepatic conditions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Pudget Sound, Washington. *JNCI* 78, 333-336.
- Nanji, A.A., Jokelainen, K., Fotouhinia, M., Rahemtulla, A., Thomas, P., Tipoe, G.L., Su, G.L., Dannenberg, A.J. 2001 Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281(6) 1348-56.
- Narnaware, Y.K., Kelly, S.P., Woo, N.Y.S. 2000. Effect of salinity and ration size on macrophage phagocytosis in juvenile black sea bream (*Mylio macrocephalus*). *J. Appl. Ichthyol./Z. Angew. Ichthyol.* 2, 86-88.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Cohn, Z.A. 1981. The macrophage as an effector cell. *N. Engl. J. Med.* 152, 622-626.
- Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB* 6, 3051-3064.
- Nathan, C., Xie, Q. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269, 13725-13728.
- Nebert, D.W., Petersen, D.D., Fornace, A.J. 1990. Cellular responses to oxidative stress: the (Ah) gene battery as a paradigm. *Environ. Health Perspect.* 88, 13-25.
- Neumann, N.F., Fagan, D., Belosevic, M. 1995. Macrophage activating factors secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leucocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 19(6), 473-482.
- Nicholson, S. 2001. Ecocytological and toxicological responses to copper in *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes. *Chemosphere* 45(4-5) 399-407.
- Niimi, A.J., Oliver, B.G. 1983. Biological half-lives of polychlorinated biphenyl (PCB) congeners in whole fish and muscle of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40(9) 1388-1394.

- Nolan, J. P. 1981. Endotoxin, reticuloendothelial function and liver injury. *Hepatology* 1, 458-465.
- Olivier, G., Eaton, C.A., Campbell, N. 1986. Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12(1-4) 223-234.
- Oruc, E.O., Uener, N. 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 127(3) 291-296.
- Palace, V.P., Brown, S.B. 1994. HPLC determination of tocopherol, retinol, dehydroretinol and retinylpalmitate in tissue of lake char (*Salvelinus namaycush*) exposed to coplanar 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 473-476.
- Panara, F. 1997. Acid phosphatases of *Esox lucius*: Tissue distribution and partial characterization. *J. Fish Biol.* 51( 2) 275-283.
- Panara, F., Angiolillo, A., Fagotti, A., Di Rosa, I., Pascolini, R. 1993. Comparative biochemistry of vertebrate acid phosphatases. *Trends in Comp. Biochem. Physiol.* 1, 675-692.
- Papadimitriou, J.M., Spector, W.G. 1971. The origin, properties and fate of epitheloid cells. *J. Pathol.* 105, 187-203.
- Papadimitriou, J.M., Spector, W.G. 1972. The ultrastructure of high- and low-turnover inflammatory granulomata. *J. Pathol.* 106, 37-43.
- Parke, D.V. 1987. Activation mechanisms to chemical toxicity. *Arch. Toxicol.* 60, 5-15.
- Payne, J.F., Fancey, L.F. 1989. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: change in melano-macrophage centers in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon- contaminated sediments. *Mar. Environ. Res.* 28, 431-435.
- Perry, J.M., Marletta, M.A. 1998. Effects of transition metals on nitric oxide synthase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11101-11106.
- Pesanti, E.L., Axline, S.G. 1975. Colchicine effects on lysosomal enzyme induction and intracellular degradation in the cultivated macrophage. *J. Exp. Med.* 141, 1030-1046.
- Pflugfelder, O. 1977. *Wirtstierreaktionen auf Zooparasiten*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Picer, M., Picer, N. 1994. Levels and long-term trends of polychlorinated biphenyls and DDTs in mussels collected from the Middle Adriatic coastal waters. *Chemosphere* 29(3) 465-475.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M., Ramanathan, K. 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 46, 43-54.
- Posthuma, L., Hogervorst, R.F., Joose, E.N.G., Van Straalen, N.M. 1993. Genetic variation and covariation for characteristics associated with cadmium tolerance in natural populations of the springtail *Orchesella cincta* (L.). *Evolution* 47, 619-631.
- Potoka, D.A., Takao, S., Owaki, T., Bulkley, G.B. Klein, A.S. 1998. Endothelial cells potentiate oxidant-mediated Kupffer cell phagocytic killing. *Free Rad. Biol. Med.* 24(7/8) 1217-1227.
- Pulsford, A.L., Crampe, M., Langston, A., Glynn, P.J. 1995. Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 631-643.
- Pulsford, A.L., Lemaire-Gony, S., Farley, S.R. 1992. Effects of environmental stress on dab *Limanda limanda* immune system. ICES CM 1992/E14 Marine Environment Quality Committee.
- Pulsford, A.L., Thomas, M.E., Lemaire-Gony, S., Coles, J., Fossato, V.U., Pipe, R.K. 1995. Studies on the immune system of the goby, *Zosterisessor ophiocephalus*, from the Venice Lagoon. *Mar. Pollut. Bull.* 30 (9), 586-591.

- Qin, Q.W., Ototake, M., Noguchi, K., Soma, G.-I., Yokomizo, Y., Nakanishi, T. 2001. Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )-like factor produced by macrophages in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 245-256.
- Quinn, M.T. 1995. Low-molecular-weight GTP-binding proteins and leukocyte signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* 58(3) 263-76.
- Rai, P.K., Rai, L. C. 1997. Interactive effects of UV-B and Cu on photosynthesis, uptake and metabolism of nutrients in a green alga *Chlorella vulgaris* under stimulated ozone column. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43(5) 281-288.
- Rashatwar, S., Ilyas, R. 1983. Effect of chronic herbicide intoxication on in vivo activities of certain enzymes in the liver of freshwater fish *Nemachelius denisonii* (Day). *Toxicol. Lett.* 16(3-4) 249-252.
- Ratnam, S., Mookerjee, S. 1998. The regulation of superoxide generation and nitric oxide synthesis by C-reactive protein. *Immunology* 94(4) 560-8.
- Reiners, J.J.jr., Lee, J.-Y., Clift, R.E., Dudley, D.T., Myrand, S.P. 1998. PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol. Pharmacol.* 53, 438-445.
- Risebrough, R.W., de Lappe, B.W., Younghans-Haug, C. 1990. PCB and PCT contamination in Winter Quarters Bay, Antarctica. *Mar. Pollut. Bull.* 21(11) 523-529.
- Romeo, M., Bennani, M., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* 48, 185-194.
- Romeo, M., Cosson, R.P., Gnassia-Barelli, M., Risso, C., Stien, X., Lafauri, M. 1997. Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P. *Mar. Environ. Res.* 44, 275-284.
- Ross, P., De Swart, R., Addison, R., Van Loveren, H., Vos, J., Osterhaus, A. 1996. Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: Wildlife at risk? *Toxicology* 112(2) 157-169.
- Roszell, I.F., Anderson, R.S. 1996. Effect of chronic in vivo exposure to pentachlorophenol on non-specific immune functions in *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.* 42, 191-194.
- Sachs, L. 1978. *Angewandte Statistik.* ( 5. Aufl.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Sastry, K.V., Gupta, P.K. 1979. Enzyme alterations in the digestive system of *Heteropneustes fossilis* induced by lead nitrate. *Toxicol. Lett.* 3(3) 145-150.
- Schauenstein, E. 1967. Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products. *J. Lipid Res.* 8(5) 417-428.
- Schmolke, S. R., Broeg, K., Zander, S., Bissinger, V., Hansen, P. D., Kress, N., Herut, B., Jantzen, E., Krüner, G., Sturm, A., Körting, W., Westernhagen, H. v. 1999. Multivariate statistical approach to the temporal and spatial patterns of selected bioindicators observed in the North Sea during the years 1995 to 1997. *Helgoland Mar. Res.* 53, 257-266.
- Secombes, C.J., Chung, S., Jeffries, A.H. 1988. Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome c. *Dev. Comp. Immunol.* 12, 201-206.
- Secombes, C.J. 1994. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 421-436.
- Secombes, C.J., Chappell, L.H. 1996. Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. *Ann. Rev. Fish Dis.* 6., 167-177.
- Secombes, C.J., Cross, A.R., Sharp, G.J.E., Garcia, R. 1992. NADPH oxidase-like activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) macrophages *Dev. Comp. Immunol.* 16, 405-413.

- Secombes, C.J., Fletcher, T.C. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2, 53-77.
- Shepard, J.L., Bradley, B.P. 2000. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. *Mar. Environ. Res.* 50(1-5) 457-463.
- Shimeno, S. 1972. Studies on hexose monophosphate shunt of fishes. 1. Properties of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase of barracuda. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 38(6) 645-650.
- Shimeno, S., Takeda, M. 1973. Studies on hexose-monophosphate shunt of fishes- 2. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 39(4) 461-466.
- Shimojo, T., Hiroe, M., Ishiyama, S., Ito, H., Nishikawa, T., Marumo, F. 1999. Nitric oxide induces apoptotic death of cardiomyocytes via a cyclic-GMP-dependent pathway. *Exp. Cell Res.* 247(1) 38-47.
- Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Halbrook, R.S. 1992. Biological markers of environmental and ecological contamination: An overview. *Risk. Anal.* 12(3) 353-360.
- Silkworth, J.B., Antrim, L., Kaminsky, L.S. 1984. Correlations between polychlorinated biphenyl immunotoxicity, the aromatic hydrocarbon locus, and liver microsomal enzyme induction in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 75 (1) 156-165.
- Sindermann, C.J. 1979. Pollution-associated diseases and abnormalities of fish and shellfish: a review. *Fish. Bull.* 76(4), 717-749.
- Sindermann, C.J. 1996. *Ocean pollution: Effects on living resources and humans.* CRC PRESS, INC., BOCA RATON, FL (USA), 275 pp.
- Smedsrod, B., De Bleser, P.J., Braet, F., Loviseti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E., Geerts, A. 1994. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 35, 1509-1516.
- Spaer, P.A., Moon, T.W., Peakall, D.B. 1986. Liver retinoid concentrations in natural populations of herring gulls (*Larus argentatus*) contaminated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and in ring doves injected with a dioxin analogue. *Can. J. Zool.* 64, 204-208.
- Spolarics, Z., Navarro, L. 1994. Endotoxin stimulates the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Kupffer and hepatic endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 56(4) 453-457.
- Spolarics, Z., Wu, J.-X. 1997. Tumor necrosis factor alpha augments the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat hepatic endothelial and Kupffer cells. *Life Sciences* 60(8) 565-571.
- Spolarics, Z. 1998. Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid. *J. Leukoc. Biol.* 63, 534-541.
- Stave, J.W., Roberson, B.S., Hetrick, F.M. 1983. Chemiluminescence of phagocytic cells isolated from pronephros of striped bass. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 269-276.
- Stegeman, J.J., Hahn, M.E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, D.C. Malins, G.K. Ostrander (eds.) Lewis Publishers, Boca Raton, 87-204.
- Steiner, L., Kröncke, K.-D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V. 1997. Endothelial cells as cytotoxic effector cells: cytokine activated islet endothelial cells lyse syngenic islet cells via nitric oxide. *Diabetologia* 40, 150-155.
- Stryer, L., 1988. *Biochemie*, Spektrum Acad. Verlag, New York.
- Stuart, A.E. 1970. *The reticulo-endothelial system.* Edinburgh: E.& S. Livingstone.
- Stumpf, H., Bannasch, P. 1994. Overexpression of glucose 6-phosphate-dehydrogenases in rat hepatic preneoplasia and neoplasia. *Internat. J. Oncol.* 5, 1255-1260.
- Sweet, L.I. 1999. Impacts of Mercury, Polychlorinated Biphenyl, and Hexachlorocyclohexane Isomer Contaminants on Human and Fish Immune System Cells. *Diss. Abst. Int. Pt. B - Sci. & Eng.* 60 (5), 2049.

- Szabo, C., O'Connor, M., Salzman, A.L. 1997. Endogenously produced peroxynitrite induces the oxidation of mitochondrial and nuclear proteins in immunostimulated macrophages. *FEBS Lett.* 409(2) 147-50.
- Tafalla, C., Novoa, B. 2000. Requirements of nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 623-631.
- Tam, M.R., Reddy, A.L., Karp, R.D., Hildemann, W.H. 1976. Phylogeny of cellular immunity among vertebrates. In: *Comparative Immunology*. J.J. Marchalonis (ed.) Oxford, Blackwell Scientific Publications 98-119.
- Tanabe, S., Hidaka, H., Tatsukawa, R. 1983. PCBs and chlorinated hydrocarbon pesticides in Antarctic atmosphere and hydrosphere. *Chemosphere* 12(2) 277-288.
- Tatner, M.F., Manning, M.J. 1985. The ontogenetic development of the reticulo-endothelial system in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* 8(2), 189-195.
- Teh, S.J., Hinton, D.E. 1998. Gender-specific growth and hepatic neoplasia in medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 41(1-2) 141-159.
- Thompson, J.N. 1976. Fat-soluble vitamins. *Comp. Anim. Nutr.* 1, 99-135.
- Thomson, J.M., 1986. Mugilidae. In J. Daget, J.-P. Gosse and D.F.E. Thys van den Audenaerde (eds.) Check-list of the freshwater fishes of Africa (CLOFFA). ISNB, Brussels, MRAC., Tervuren., and ORSTOM, Paris. 2, 344-349.
- Thrasher, A.J., Keep, N.H., Wientjes, F., Segal, A.W. 1994. Chronic granulomatous disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1227, 1-24.
- Tort, L., Padros, F., Rotllant, J., Crespo, S. 1998. Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish Shellfish Immunol.* 8 (1) 37-47.
- Troncoso, L., Galleguillos, R., Larrain, A. 2000. Effects of copper on the fitness of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Mollusca:Bivalvia). *Hydrobiologia* 420, 185-189.
- Tsai, K.J., Hung, I.-J., Chow, C.K., Stern, A., Chao, S.S., Chiu, D. T.-Y. 1998. Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate-dehydrogenase-deficient granulocytes. *FEBS Lett.* 436, 411-414.
- Van der Oost, R., Heida, H., Opperhuizen, A. 1988. Polychlorinated biphenyl congeners in sediments, plankton, molluscs, crustaceans, and eel in a freshwater lake: Implications of using reference chemicals and indicator organisms in bioaccumulation studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17(6) 721-729.
- Van Noorden, C.J.F., Frederiks, W.M. 1992. *Enzyme Histochemistry*. Oxford University Press. Royal Microscopy Society.
- Van Noorden, C.J.F., Jonges, G.N. 1995. Analysis of enzyme reactions *in situ*. *Histochem. J.*, 27, 101-118.
- Van Noorden, C.J.F., Bahns, S., Köhler, A. 1997. Adaptional changes in kinetic parameters of G6PDH but not of PGDH during contamination-induced carcinogenesis in liver of North Sea flatfish. *Biochim. Biophys. Acta*, 1342, 141-148.
- Vethaak, A.D. 1993. Fish disease and marine pollution: a case study of the flounder (*Platichthys flesus*) in Dutch coastal and estuarine waters. Ph. D. thesis, Amsterdam.
- Vethaak, A.D., Jol, J.G. 1996. Diseases of flounder (*Platichthys flesus*) in Dutch coastal and estuarine waters with particular reference to environmental stress factors, Part 1. Epizoötiology of gross lesions. *Dis. Aquat. Org.* 26, 81-97.
- Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K. 1985. Significance of metallothioneins and lysosomes in cadmium toxicity and homeostasis in the digestive gland cells of mussels exposed to the metal in presence or absence of phenanthrene. *Mar. Environ. Res.* 17(2-4) 184-187.
- Villeneuve, D.C., Grant, D.L., Phillips, W.E.J., Clark, M.L., Clegg, D.J. 1971. Effects of PCB administration on microsomal enzyme activity in pregnant rabbit. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 6, 120-128.

- Vincent, S., Kumar, L.C.A., Mani, T., Ambrose, T., Selvanayagam, M. 1995. Heavy metal chromium induced alterations on phosphatases activity in the Indian major carp, *Catla catla* (Ham.). Arch. Hydrobiol. 135(2) 283-287.
- Vives Corrons, J.L., Feliu, E., Pujades, M.A., Cardellach, F., Rozman, C., Carreras, A., Jou, J.M., Vallespi, M.T., Zuazu, F.J. 1982. Severe glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency associated with chronic hemolytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections: description of a new molecular variant (G6PD Barcelona). Blood 59(2) 428-434.
- Vogelbein, W.K., Fournie, J.W., Overstreet, R.M. 1987. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centers in *Rivulus marmoratus*.
- Von Westernhagen, H., Cameron, P., Janssen, D., Kerstan, M. 1995. Age and size dependent chlorinated hydrocarbon concentrations in marine teleosts. Mar. Pollut. Bull. 30(10) 655-659.
- Vos, J.G. 1986. Immunotoxicity of hexachlorobenzene. IARC Sci. Publ. 77, 347-56.
- Wahl, E., Cameron, P., Koehler, A. et al., 1995. Fischkrankheiten im Wattenmeer. Umweltbundesamt Texte 51/95 ISSN 0722-186X, 1-216.
- Wake, K., Decker, K., Kirn, A., Knook, D.L., McCuskey, R.S., Bouwens, E., Wisse, E. 1989. Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. Int. Rev. Cytol. 118, 173-229.
- Wang P., Zweier, J.L. 1996. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. J Biol Chem. 271(46) 29223-29230.
- Wardle, E.N. 1987. Kupffer cells and their functions. Liver 7, 63-75.
- Weeks, B.A., Anderson, D.P., DuFour, A.P., Fairbrother, A., Goven, A.J., Lahvis, G.P., Peters, G. 1989. Immunological biomarkers to assess environmental stress. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M.jr., Bergmann, H.L., eds., Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Lewis, Boca Raton, FL, USA, 211-234.
- Weeks, B.A., Warinner, J.E., Mason, P.L., McGinnis, D.S. 1986. Influence of toxic chemicals on the chemotactic response of fish macrophages. J. Fish Biol. 28(6) 653-658.
- Weidner, E. 1975. Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages: parasitophorous vacuole growth and the absence of lysosomal fusion. Z. Parasitenk. 47, 1-9.
- Weidner, E., Sibley, L.D. 1985. Phagocytized intracellular microsporidian blocks phagosome acidification and phagosome-lysosome fusion. J. Protozool. 32, 311-317.
- Welcomme, R.L. 1988 International introductions of inland aquatic species. FAO Fish. Tech. Pap. No. 294. 318-329.
- White, K.L., Holsapple, M.P. 1984. Direct suppression of in vitro antibody production by mouse spleen cells by the carcinogen B(a)P but not by the noncarcinogenic congener B(e)P. Cancer Res. 44, 3388-3393.
- White, K.L., Kawabata, T.T., Ladics, G.S. 1994. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon immunotoxicity. In: Immunotoxicology and Immunopharmacology, 2<sup>nd</sup> edition, J.H. Dean, M.I. Luster, A.E. Munson, I. Kimber eds. Raven Press, New York 123-142.
- White, K.L., Lysy, H.H., Holsapple, M.P. 1985. Immunosuppression by polycyclic aromatic hydrocarbons: A structure-activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice. Immunopharmacol. 9, 155-164.
- Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R., Eshenaur, S.C., Nims, R.W. 1993. Inhibition of cytochromes-P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. Arch. Biochem. Biophys. 300, 115-123.

- Winzer, K., Köhler, A. 1998. Aldehyde dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase as markers for enzyme-altered foci in the liver of dab (*Limanda limanda* L.). *Mar. Environ. Res.* 46, 215-219.
- Winzer, K., Van Noorden, C.J.F., Köhler, A. 2001. Quantitative cytochemical analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in living isolated hepatocytes of European flounder for rapid analysis of xenobiotic effects., *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1025-1032.
- Woo, P.T.K. 1987. Immune response of fish to parasitic protozoa. *Parasitol. Today*, 3, 186-188.
- Woodland, D.J. 1990. Revision of the fish family Siganidae with descriptions of two new species and comments on distribution and biology. *Indo-Pac. Fish.* 19, 136 p.
- Xiang, Y., Rice, C.D. 2000. Expression of fish iNOS is increased by pro-inflammatory signals and xenobiotics. *Mar. Environ. Res.* 50 (1-5) 466-467.
- Yin, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M. 1997. Cytokine-mediated antimicrobial response of catfish *Clarias gariepinus* as a defense against *Aeromonas hydrophil*. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 93-104.
- Zapata, A.G., Varas, A., Torroba, M. 1992. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol. Today* 13, 142-147.
- Zeeman, M. 1986. Modulation of the immune response in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12, 235-241.
- Zelikoff, J.T. 1993. Metal pollution-induced immunomodulation in fish. In: *Annual review of fish diseases*. Pergamon Press, Oxford, 305-325.
- Zelikoff, J.T., Enane, N.A., Bowser, D., Squibb, K.S., Frenkel, K. 1991. Development of fish peritoneal macrophages as a model for higher vertebrates in immunotoxicological studies. I. Characterization of trout macrophage morphological, functional, and biochemical properties. *Fundam. Appl. Toxicol.* 16(3) 576-589.
- Zelikoff, J.T., Wang, W.W., Islam, N., Flesher, E., Twerdol, L.E. 1995. Heavy metal-induced changes in antioxidant enzymes and oxyradical production by fish phagocytes. Applications as biomarker for predicting the immunotoxic effects of metal-polluted aquatic environment. In: *Modulations of Immune Response*. SOS Publications, Fair Haven.
- Ziegenfuß, M.C., Wolke, R.E. 1991. The use of fluorescent microspheres in the study of piscine macrophage aggregate kinetics. *Dev. Comp. Immunol.* 3, 165-171.

## Zusammenfassung

Zahlreiche Stoffwechselfunktionen von Einzelmakrophagen (M $\phi$ ) der Kopfniere und Makrophagen Aggregaten (MA) der Leber verschiedener Fischarten wurden in Feldstudien auf ihre Eignung als Biomarker für die Beeinflussung des Immunsystems durch Schadstoffe untersucht.

An isolierten Makrophagen aus dem Pronephros der Flunder (*Platichthys flesus*) wurde nach Aktivierung mit dem löslichen Stimulator Phorbol Myristat Acetat (PMA) ein suppressiver Schadstoffeffekt auf die Aktivitäten von Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH), Phosphogluconat Dehydrogenase (PGDH), Aldehyd Dehydrogenase (ALDH), Saure Phosphatase (SP), sowie die Erzeugung reaktiver Sauerstoffmetabolite in Fischen aus dem belasteten Elbeästuar nachgewiesen (**Kapitel 1**). Es zeigte sich in diesen Flundern, insbesondere in weiblichen Individuen, eine „Voraktivierung“ der Makrophagen: Auch ohne vorherige Stimulierung mit PMA wurde in den Makrophagen weiblicher Tiere aus der Elbe eine signifikant höhere G6PDH Aktivität gemessen, als in den Fischen aus dem Referenzgebiet „Tiefe Rinne“ nahe Helgoland. Bei der PGDH betraf diese „Voraktivierung“ sowohl männliche, als auch weibliche Flundern von der belasteten Station. Für die SP und auch für die Nitrit Oxid Synthase (NOS) wurden keine Aktivitätsunterschiede zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Makrophagen beobachtet. Deutlich aber war die signifikant herabgesetzte SP Aktivität in Flundern aus dem belasteten Elbeästuar, verglichen mit den Fischen aus dem Referenzgebiet. Da die SP Aktivität unabhängig von der Stimulierung der Makrophagen war, wurde dieser Parameter in Makrophagenaggregaten der Leber von Flundern, Meeräschen und Kaninchenfischen in Feldstudien als potentieller *in situ*-Marker für Immunmodulation durch Schadstoffe eingesetzt.

Als Basis für die Interpretation der weiteren Ergebnisse wurde die natürliche Variabilität der MA-SP unter realen Feldbedingungen und mit Hilfe von Experimenten untersucht. Eine Änderung der Salinität von 36‰ auf 15‰ im Experiment führte zu einer kurzen Aktivitätserhöhung der MA-SP in der Flunderleber am dritten Tag nach Beginn des Experimentes (**Kapitel 2**). Nach einer Woche ließen sich keine Unterschiede in der MA-SP Aktivität zwischen in Meer- und in Brackwasser gehälterten Flundern mehr feststellen. Eine Suppression der MA-SP, wie sie in belasteten Ästuargebieten zu verzeichnen war, konnte im Experiment durch Salinitätsabsenkung nicht induziert werden.

Ein weiterer abiotischer Faktor, dessen Einfluß auf die MA-SP Aktivität an Fischen aus Referenzgebieten in Nordsee und Mittelmeer getestet wurde, war die Temperatur (**Kapitel 3**). Ein Jahresgang der MA-SP Aktivität in Flundern aus der gering belasteten Tiefen Rinne vor Helgoland zeigte einen Aktivitätsabfall bei niedrigen Wassertemperaturen im Winter und zum Frühjahrsbeginn. Trotz dieser Temperaturabhängigkeit wurden aber zu allen beprobten Jahreszeiten niedrigste MA-SP Aktivitäten in Fischen der belasteten Stationen gemessen.

Neben der Temperaturabhängigkeit wurden sowohl in Flundern, als auch in Meeräschen geschlechtsspezifische Unterschiede der MA-SP Aktivität festgestellt (**Kapitel 3&4**). In weiblichen und juvenilen Fischen wurden signifikant höhere MA-SP Aktivitäten gemessen, als in ihren männlichen Artgenossen.

Im Verlauf der Studie konnten mit Hilfe parallel durchgeführter rückstandsanalytischer Untersuchungen an identischen Fischen Schadstoffe identifiziert werden, die in besonders hohem Maße immunmodulativ wirksam waren (**Kapitel 3&4**): Bei den chlororganischen Kohlenwasserstoffen waren dies HCB, OCS, PCB 52, 101 (Flunder), PCB 153 (Meeräschen) sowie p,p-DDE. Die Konzentrationen dieser Substanzen im Fischgewebe waren signifikant negativ mit der MA-SP Aktivität korreliert. In der Gruppe der analysierten Schwermetalle zeigten Kupfer und Quecksilber die deutlichsten Effekte. In Flundern aus der Deutschen



Bucht war die Varianz der MA-SP Aktivität zu 52% alleine von der Rückstandskonzentration von Kupfer abhängig. In Meeräschen wurde eine hochsignifikante Hemmung der NOS-Aktivität durch Kupfer beobachtet. Quecksilber hingegen führte zu einer Aktivitätssteigerung der MA-SP.

Als Modell für die Veränderung von MA-Funktionen durch den Einfluss von Pathogenen wurde die Leberinfektion von *Liza aurata* mit dem einzelligen Parasiten *Myxobolus sp.* (Myxosporidia) genutzt (**Kapitel 5**). An Meeräschen aus zwei unterschiedlich stark anthropogen belasteten Gebieten der Israelischen Mittelmeerküste, die mit Hilfe histologischer Diagnostik in 3 Infektionsklassen unterteilt waren, wurden Abhängigkeiten der MA-Funktionen von Schadstoffeinfluss und/oder der Infektion ermittelt (**Kapitel 6**). Der Parameter, der hauptsächlich durch die Infektion beeinflusst wurde, war die MA-G6PDH Aktivität, die in infizierten Fischen signifikant erniedrigt war. Hauptsächlich durch Schadstoffbelastung beeinflusste Parameter waren die Anzahl der MA in der Leber, sowie deren PGDH Aktivität. Beides war in hoch belasteten Fischen signifikant herabgesetzt. Die Größe der MA und ihre SP- und NOS-Aktivität, sowie die Lysosomenmembranstabilität in Hepatozyten wurden sowohl durch die Infektion, als auch durch Schadstoffbelastung beeinflusst.

Basierend auf den Ergebnissen der oben beschriebenen grundlegenden Untersuchungen wurden für die Anwendung der MA-SP Aktivität als **Biomarker für Immunmodulation** und deren Einbeziehung in das integrierte biologische Effektmonitoring nur die Daten aus einer Jahreszeit (Herbst der Jahre 1995-2000) und einem Geschlecht (männlich), sowie aus nicht infizierten Fischen berücksichtigt (**Kapitel 3**). Ansätze für ein integriertes biologisches Effektmonitoring umfassen die Anwendung verschiedener Biomarker, die Rückschlüsse auf Schadstoff-induzierte Effekte auf verschiedenen Ebenen der biologischen Organisation zulassen. Die grundlegende Hypothese war, dass nur auf diesem Wege abzuschätzen ist, wie weit die Schädigung des biologischen Systems „Küste“ durch anthropogene Einflüsse fortgeschritten ist. Neben der Größe der MA und der MA-SP Aktivität wurden die Lysosomenmembranstabilität von Hepatozyten und die EROD Aktivität als bereits validierte und vom ICES (International Council for the Exploration of the Sea) für den Einsatz im biologischen Effektmonitoring empfohlene Biomarker am individuellen Fisch untersucht. Außerdem kamen Parameter wie die Akkumulation von Neutrallipiden in der Leber, sowie verschiedene parasitologische Indices und Indikatorarten zum Einsatz. Letztere dienten, untersucht von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Körting, als Marker für Veränderungen auf dem Niveau der Lebensgemeinschaft. Basierend auf der Information dieser biologischen Daten war es möglich, eine Reaktionsabfolge der Biomarkerantworten zu berechnen, die Auskunft über die „Umweltgesundheit“ auf einzelnen Stationen in der Deutschen Bucht geben konnte. Außerdem wurde eine massive Schadstoffeinleitung in die Elbe, die bis zu diesem Zeitpunkt unerkannt geblieben war, aufgedeckt und die Folgen der Elbevertiefung für das biologische System sichtbar gemacht. Die histochemischen MA-Parameter dienten hierbei als zentrales Verbindungsglied zwischen frühen Effekten auf subzellulärer Ebene, sichtbar in der Herabsetzung der Lysosomenmembranstabilität und in der Induktion der EROD Aktivität und späten Effekten: Der Verringerung der Anzahl verschiedener Parasitenarten im Fisch.

Die Anwendung von MA-Parametern im integrierten biologischen Effektmonitoring ist somit eine wichtige Ergänzung zu anderen biochemischen und subzellulären Testverfahren. Sie gibt Auskunft über die Schädigung der unspezifischen Immunantwort und ist als Marker für fortgeschrittene Schädigung von Relevanz, um Aussagen über Veränderungen des biologischen Systems durch anthropogene Einflüsse treffen zu können.

Schlagwörter: Immunmodulation, Biologisches Effekt Monitoring, Fisch.

## Summary

Various metabolic functions of single macrophages (M $\phi$ ) of the head-kidney and macrophage aggregates (MA) in the livers of different fish species were tested in field studies for their use as biomarkers for pollution induced immunomodulation.

In isolated living head-kidney macrophages of flounder (*Platichthys flesus*) from the polluted Elbe estuary, stimulated by phorbol-myristate-acetate (PMA), a suppression of enzyme activities, compared to fish from the reference location “Tiefe Rinne” was assessed for: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), phosphogluconate dehydrogenase (PGDH), aldehyde dehydrogenase (ALDH), acid phosphatase (AP) and for the generation of reactive oxygen species (ROS) (**Chapter 1**). On the other hand, we detected a higher G6PDH activity in unstimulated macrophages of female Elbe fish, compared to those from female and male reference flounder. This kind of ‘inadequate activation’ was also observed for PGDH in female and male flounder from the Elbe estuary. Neither AP, nor nitric oxide synthase (NOS) displayed differences of activities following to PMA stimulation in both, Elbe and reference flounder. Nevertheless, the basic AP activity was significantly lower in flounder from the Elbe estuary, compared to flounder from the Tiefe Rinne. Based on the fact, that stimulation did not change AP activity, this parameter was chosen for the application on macrophage aggregates in the liver of flounder by using *in situ* histochemical techniques.

The prerequisite for the application of biomarkers is the basic knowledge of interferences with natural variations like seasonality, changes in salinity and development, as well as gender specific differences. The variability of MA-AP in the livers of flounder and mullet (*Liza aurata*) was assessed in the field and in experiments. The change of salinity from 36‰ to 15‰ led to a short-term increase of MA-AP activity at the third day of the experiment. At the next sampling, 4 days later, no differences in MA-AP activity between flounder kept in 36‰ and flounder kept in 15‰ could be observed any longer (**Chapter 2**). A suppression of MA-AP activity, as assessed in flounder from polluted estuarine areas with low salinity could not be induced by reducing the salinity.

Another abiotic factor possibly affecting the MA-AP activity in the liver of fish is the water temperature (**Chapter 3**). In the time course of one year, MA-AP activity was measured in flounder from the reference location “Tiefe Rinne”. Data showed a strong temperature dependency of MA-AP activity with lowest activities in winter and early spring and highest activities in the summer and early autumn. Yet, in all seasons, flounder and mullet from the polluted locations had lower MA-AP activity, compared to the respective reference fish (**Chapter 3&4**).

Beside the temperature-dependency, gender-specific differences of MA-AP activities were observed in flounder as well as in mullets. Female and juvenile fish displayed significantly higher AP- activities than male fish (**Chapter 3&4**).

Analyses of the tissue concentrations of standard organochlorines and heavy metals in individual fish allowed the identification of contaminants with a relevant immunomodulative capacity. Strongest suppressive effects, reflected by significantly negative correlations between contaminant tissue concentrations and MA-AP activity were assessed for: HCB, OCS, PCB 52, 101 (flounder), PCB 153 (mullet) and p,p-DDE. Copper and mercury showed the most intense effects of all heavy metals analysed. The tissue concentrations of copper accounted for 52% of the total variability of MA-AP activity in flounder liver. In mullets a highly significant suppression of NOS activity with increasing tissue concentration of copper was detected. Mercury, in contrast, led to an increase of MA-AP activity.

Liver infection with a myxosporidian parasite (*Myxobolus sp.*) in *Liza aurata* was used to elucidate the effects of pathogens on the metabolic functions of MA in the liver of fish (**Chapter 5**). In mullets from two differently polluted areas of the Israeli Mediterranean Sea coast, separated in three classes of infection intensity, changes of MA functions caused by pollution and/or infection were assessed (**Chapter 6**).

The MA-G6PDH activity was mainly influenced by the liver infection with *Myxobolus*. MA-G6PDH was significantly suppressed in infected mullets. The parameters, mainly affected by pollution were: i. the number of MA in the liver of fish and ii. the MA-PGDH activity. Both of them were significantly decreased in mullets from the Haifa Bay with a high contaminant burden. The size of MA, the MA-AP activity and the lysosomal membrane stability of hepatocytes were affected by both, infection and pollution.

On the basis of these information, only MA-AP activity data from one season (autumn 1995-2000), one gender (male) without liver infections, were included in the integrated biological effect monitoring approach (**Chapter 3**).

Integrated biological effect monitoring comprises the implementation of different biomarkers, which reflect pollution-induced effects on several levels of biological organisation. The basic hypothesis is, that this concept might be used for the quantification of the disturbance of the biological system caused by pollution. Beside the MA size and MA-AP activity, the stability of lysosomal membranes of hepatocytes and the EROD-activity, two biomarkers, which are already validated and recommended by the ICES (International Council for the Exploration of the Sea) for the application in biological effect monitoring programmes, were applied in same individual fish. In addition the accumulation of neutral lipid in the liver and various parasitological indices and indicator species were also assessed. The latter were determined by the working group of Prof. Körting as markers for effects on the biocoenosis-level. Based on all biological information, a progression of biomarker responses could be calculated with specific “key events” for sequential alteration induced by pollution. In addition, a hitherto unrecognised pollution event in the river Elbe was discovered by using this set of biomarkers (Broeg et al., 1999). The histochemical MA-parameters served as a central link between early responses of sub cellular markers such as lysosomal membrane stability and EROD activity and the late responses, the decrease in parasite diversity in the fish.

MA-parameters, especially the MA-SP activity may therefore be used as an amendment of other biochemical and histochemical tests in the context of the integrated biological effect monitoring. On one hand side they are able to reflect sensitively the modulation of the non-specific immune response in fish, on the other hand they may serve as markers for advanced disturbances of the biological system, caused by anthropogenic impact.

Keywords: Immunomodulation, biological effect monitoring, fish.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie meinen Betreuern, Dr. Angela Köhler-Günther, Prof. Dr. Dieter Steinhagen und Dr. Hein von Westernhagen, die mich auf dem Weg zu dieser Arbeit begleitet haben und stets mit Anregungen, Diskussionen und auch mit Trost und Ermunterung an meiner Seite standen.

Ich danke dem Alfred-Wegener-Institut für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des Forschungskutters „Uthörn“.

Herrn Hornke und Herrn Dr. Paulenz danke ich für die Möglichkeit einer weiteren Anstellung am AWI nach Beendigung des MARS-Projektes vor zwei Jahren.

Ich danke dem BMBF und hier ganz speziell Prof. Dr. Schöttler, BEO (Projekte MARS 1 und 2: „Deutsch-Israelische Zusammenarbeit in der Meeresforschung“), der EU (Projekt BEEP: Biological Effects of Environmental Pollution), sowie der Bundesanstalt für Arbeit für die finanzielle Unterstützung in den vergangenen 7 Jahren, die diese Arbeit erst möglich machte.

Vielen weiteren Menschen ist der Abschluss dieser Dissertation zu verdanken. Ohne sie wäre es nicht möglich gewesen all das umzusetzen, aus dem sich das hier vorliegende „Werk“ zusammensetzt. So danke ich von ganzem Herzen: Sieglinde Bahns (danke für alles !!!!), Dr. Arik Diamant, Timo Kaminski, Prof. Dr. Wolfgang Körting, Günther Krüner, Giesela Lammers, Alexander Lüdeking, Prof. Dr. Ilan Paperna (ich bin nicht wirklich ruhiger geworden!), Babett Peschel, Andreas Skouras, Dr. Stefan Schmolke, Dr. Gesche Winkler, Dr. Katja Winzer und Susanne Zander.

Mein ganz besonderer Dank gilt Hans-Carl Lührs und der Crew der „Uthörn“, die für mich im Laufe der Jahre ein zweites Zuhause geworden ist (und wir fahren doch noch ins Rote Meer!).

Die Liste ist sicher nicht vollständig! Allen helfenden Händen, Köpfen und Seelen, die in den vergangenen Jahren mit mir zusammen gewirkt haben, sei an dieser Stelle herzlich gedankt. Ich habe viel von euch allen gelernt!

Meine Familie hat im Laufe der Jahre immer wieder für längere Zeit auf mich und nicht zuletzt auch auf materielle Sicherheit verzichten müssen - und sich dabei nicht nur prächtig gehalten, sondern mir immer den Rücken gestärkt. Es geht jetzt bergauf, ihr Lieben!

Ich danke all meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre offenen Ohren und Herzen.

Eins noch: Jetzt, wo ich hier sitze, 11.10.2002, 22 Uhr 16, spüre ich es das erste Mal seit langer Zeit: ich bin stolz und glücklich!

Und dafür bin ich dankbar.

## Lebenslauf

Katja Broeg, geb. Richter,  
Geboren am 15.12.1962 in Hamburg-Harburg.  
Verheiratet, 2 Kinder.

### *Schullaufbahn:*

1969-1973                    Grundschule Weusthoffstr., Hamburg.  
1973-1982                    Friedrich Ebert Gymnasium, Hamburg.

### *Ausbildungen:*

1982                            Ausbildung zur Schwesternhelferin, Johanniter-Unfall-Hilfe, Hamburg.  
1984-1986                    Ausbildung zur Landwirtschaftlich-Technischen Assistentin, Lüneburg.

### *Studium:*

1987-1994                    Studium der Biologie, Schwerpunkte Zoologie, Biochemie und Hydrobiologie, Universität Hamburg.

### *Berufstätigkeiten:*

1982/1983                    Tierpflegerin im Tierheim Graz, Österreich.  
1983                            Pferdetrainerin bei Hans-Johann Stamp, Trabrennbahn Hamburg.  
1983/1984                    Altenpflegehelferin im Altenheim Tostedt.  
1986/1987                    Technische Assistentin an der Biologischen Anstalt Helgoland (BAH), Hamburg.  
1988-1994                    Studentische Hilfskraft an der BAH, Hamburg.  
1995-2000                    Wissenschaftliche Angestellte an der BAH/AWI, BMBF-Projekte MARS 1 und 2, Deutsch-Israelische Zusammenarbeit in der Meeresforschung, Projektleitung, Dr. H. v. Westernhagen, Hamburg, Bremerhaven.  
2000 bis jetzt                Doktorandin am Alfred-Wegener-Institut, EU-Projekt BEEP, Biological Effects of Environmental Pollution, Projektleitung, Dr. A. Köhler-Günther, Bremerhaven.