

Wirkung hormonartiger Substanzen in Gewässern

 Veränderungen beim Zebrafisch (*Danio rerio*) nach *low-dose* Belastung mit 17α -Ethinylöstradiol im *Fish Sexual Development Test* (FSDT)

ID U54-S04-N12

EINLEITUNG

Der Eintrag von hormonartig wirkenden Stoffen insbesondere in die aquatische Umwelt ist ein latentes und nach neueren Untersuchungen auch unterschätztes Problem. Da hormonaktive Substanzen häufig schon bei sehr geringer Konzentration ihre negative Wirkung entfalten, sollten die zur Detektion in der Umwelt verwendeten Biomarker sensitiv genug sein, um auch bei geringen Mengen schon einen deutlichen Effekt zu zeigen. Als wichtigste Biomarker für eine östrogene Gewässerbelastung sind mittlerweile die Vitellogenininduktion, die Gonadenhistologie und das Geschlechterverhältnis von Fischen anerkannt. Dabei liegt das ‚sensitive Fenster‘ für endokrine Störungen bei Fischen im Zeitraum der Geschlechtsdifferenzierung und der Gonadenreifung. Bei den meisten kleinen Versuchsfischarten wie dem Zebrafisch (*Danio rerio*) wird dieses Fenster vom Fish Sexual Development Test (FSDT) abgedeckt, der eine kontinuierliche Exposition über 60 Tage ab dem befruchteten Ei vorsieht (OECD, 2010).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Ermittlung der NOEC- und LOEC-Werte für 17α -Ethinylöstradiol (EE2) in einem FSDT mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*).



Abbildung: Zebrafisch

Daraus ergibt sich die Wirkungsschwelle, die als Kriterium für die Bewertung von Messergebnissen im Freiland dient.

METHODIK

Getestet wurde mit 2 Replikaten je 40 Individuen. Die Fische wurden im kontinuierlichen Durchfluss über das Aquariumswasser gegen EE2 in Konzentrationen von 0,1 – 0,5 – 1,0 ng/L exponiert. Als Lösungsvermittler diente DMSO in Konzentrationen von $\leq 0,02 \mu\text{L/L}$.

Chemisch-analytisch wurden die eingestellten EE2-Konzentrationen vom Betriebs- und Forschungslabor des



Zweckverbandes Landeswasserversorgung in Langenau und mittels Zelltest (ER-CALUX®) vom Labor der Firma ‚BioDetection Systems‘ (BDS) in Amsterdam überprüft.

ERGEBNISSE

Schlupferfolg und Geschlechterverhältnis

Während die Einstellung der vorgegebenen EE2-Konzentrationen nach der chemischen Kontrolle im Großen und Ganzen als gelungen zu bezeichnen ist, verzeichnete der Zelltest in vielen aber nicht allen Fällen die doppelte EE2-Konzentration. Eine mögliche Erklärung ist die Störung des Zelltests durch gelöste organische Substanzen aus den Verbindungsschläuchen der Wasser- und Chemikalien-Zufuhr (Chen et al., 2012).

Schlupferfolg und Mortalität der Kontrollfische lagen im von der OECD geforderten Sollbereich des Tests. Verhaltensstörungen und Missbildungen konnten nicht beobachtet werden. Weder bei der Länge noch beim Gewicht der Fische aus den einzelnen Versuchsgruppen und Replikaten wurden bei Testende signifikante Unterschiede festgestellt.

Das Geschlechterverhältnis schwankte bereits zwischen Wasser- und Lösungsmittel-Kontrolle auffällig. Die mittlere Expositionsgruppe (0,5 ng/L EE2) wies einen signifikant erhöhten Weibchenanteil gegenüber der Wasserkontrolle auf, nicht jedoch gegenüber der DMSO-Kontrolle. In der höchsten Konzentration (1 ng/L EE2) war das Geschlechterverhältnis ebenfalls in Richtung der Weibchen verschoben (nicht signifikant, da die Mortalität bei dieser Belastung eine statistische Auswertung erschwerte).

Niedrige EE2-Konzentrationen (0,1 ng/L) scheinen einen negativen Einfluss auf die Gonadenentwicklung zu haben (verstärktes Auftreten von Zwittergonaden). Bei

den Weibchen konnte zu Versuchsende eine dosisabhängig weiter fortgeschrittene Ovarienreife ab 0,5 ng/L EE2 beobachtet werden. Bei den Männchen bewirkte die Belastung mit EE2 eine verringerte Hodenreife, die bereits bei 0,1 ng/L signifikant war ($p = 0,02$).

Histopathologische Veränderungen

Die Untersuchung der Gonaden ergab nach Belastung mit EE2 einige histopathologische Veränderungen. Die Anzahl der Einzelveränderungen ungeachtet des Schweregrads unterschied sich bei den Weibchen ab $\geq 0,5$ ng/L EE2 hochsignifikant ($p < 0,001$) von den Kontrolltieren. Bei den Männchen war die Anzahl der Einzelbefunde nur bei 0,5 ng/L signifikant erhöht ($p = 0,025$).

Wasser-Kontrolle

Bei 10% der Weibchen konnte eine geringfügige Ansammlung von proteinartiger Flüssigkeit im Ovar beobachtet werden, welches vermutlich auf den Abbau nicht abgelaichter Eier zurückzuführen ist. Als Cysten bezeichnete Hohlräume in der Gonade konnten bei 16% der Kontrollweibchen beobachtet werden.

DMSO-Kontrolle

Bei den Männchen war das einzig auffällige Merkmal die minimale Ausbildung von Zwittergonaden (Testis-ova) bei 6% der Tiere.

Bei den Weibchen konnte eine geringfügige Ansammlung von proteinartiger Flüssigkeit im Ovar bei 12% der Tiere beobachtet werden. Eine geringgradige Cystenbildung trat bei 21% der Weibchen auf.

0,1 ng/L EE2

Die Männchen dieser Gruppe zeigten als auffälligste Veränderung das starke Auftreten von Testis-ova. Hier konnte das einzige Testis-ovum mit Schweregrad 4 beobachtet werden. Außerdem zeigte ein Individuum eine deutliche Degeneration des Hodens.

Bei den Weibchen zeigten 23% geringgradige Ansammlungen proteinartiger Flüssigkeit im Ovar. Betroffen waren mehr als doppelt so viele Fische wie in der Kontrolle. Auch Cysten (23%) traten mehr als doppelt so häufig wie in der Wasserkontrolle auf (allerdings kaum mehr als in der DMSO-Kontrolle).

0,5 ng/L EE2

Die Männchen zeigten eine signifikante ($p = 0,045$) Abnahme der Spermiedichte in den *Tubuli seminiferi*.

Proteinartige Flüssigkeit im Ovar trat bei 32% der Weibchen auf. Auch zeigten die Weibchen bei 0,5 ng/L signifikant häufiger ($p = 0,024$) eine interstitielle Fibrose des Ovars (43%) sowie eine signifikante ($p = 0,007$) Abundanz von Cysten (24%), die bei 11% der Weibchen auch deutlich stärker ausgeprägt war als bei der Kontrolle.

1 ng/L EE2

Die Männchen zeigten einen leichten Rückgang der Spermienzahl, der wegen der verringerten Hodenreife weniger stark ausgeprägt war als bei 0,5 ng/L und auch wegen der erhöhten Mortalität weniger gut statistisch zu belegen war.

Bei den Weibchen waren die signifikant häufiger auftretende Ansammlung von proteinartiger Flüssigkeit (59%, $p = 0,002$) in der Gonade, eine interstitielle Fibrose (55%, $p = 0,003$) sowie Cysten mit 46% die bedeutendsten Effekte.

Bewertung

Die Gegenüberstellung der Einzelergebnisse (Tabelle) zeigt, dass für die meisten der untersuchten Parameter die NOEC bei 0,1 ng/L, die LOEC bei 0,5 ng/L liegt. Dies gilt insbesondere für die Endpunkte Reifegrad und Anzahl der histologischen Veränderungen bei den Weibchen. Das Auftreten von proteinartiger Flüssigkeit bei den Weibchen zeigte ebenfalls eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, allerdings lag hier die NOEC bei 0,5 ng/L.

Der Vitellogeningehalt (VTG-Gehalt) fiel zuerst bei 0,1 ng/L EE2 signifikant ab, bevor der Wert nach Belastung mit 0,5 ng/L signifikant anstieg.

Als niedrigste populationsrelevante LOAEC ergibt sich 0,5 ng/L (mehrere signifikante Veränderungen), als entsprechende NOAEC 0,1 ng/L (keine statistische Signifikanz außer bei der Hodenreife und der Suppression des natürlicherweise in männlichen Individuen vorkommenden VTG).

DISKUSSION

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zu den adversen Effekten von EE2 durchgeführt, wobei in den meisten Fällen deutlich höhere Konzentrationen getestet wurden. Einige Studien konnten bei Konzentrationen ab 3 ng/L EE2 eine komplette Verweiblichung aller Versuchsfische zeigen (Fenske et al., 2005; Nash et al., 2004; Maack & Segner, 2004; Örn et al., 2006). In der vorliegenden Studie war bereits bei einer Belastung mit 0,5 ng/L EE2 eine Zunahme der Weibchen an der Gesamtpopulation zu beobachten, allerdings folgte die höchste Konzentration diesem Trend nicht.

Die in dieser Studie beobachtete signifikante Verringerung der Hodenreife nach Exposition gegenüber EE2 (LOEC = 0,1 ng/L) deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen ab 1 ng/L (Weber et al., 2003) bzw. 3 ng/L (Fenske et al., 2005), bei denen die Fische in partiellen *Life-cycle*-Studien und in einer Studie adulte Zebrafische in einer Kurzzeitexposition (max. 24 Tage) getestet wurden (van den Belt et al., 2001, LOEC = 10 ng/L EE2). Weitere Übereinstimmungen bestehen bei den histopathologischen Effekten der Weibchen. So berichten auch andere Studien von einer verstärkten Atresie vitellogener Eistadien (Maack & Segner, 2004; van den Belt et al., 2001). Hier ist anzumerken, dass die in der vorliegenden Studie beobachteten Cysten ebenfalls eine Form der Atresie darstellen.

Tabelle: Zusammenstellung der für die einzelnen Parameter ermittelten NOEC- und LOEC-Werte nach Exposition gegenüber Ethinylöstradiol im FSDT mit dem Zebrafisch. Die **fett** angegebenen Werte kennzeichnen Parameter, bei denen die höchste Konzentration nicht signifikant verändert war (-: keine Wirkung nachgewiesen)

	ARTSPEZIFISCH		WEIBCHEN		MÄNNCHEN	
	NOEC (ng/L)	LOEC (ng/L)	NOEC (ng/L)	LOEC (ng/L)	NOEC (ng/L)	LOEC (ng/L)
Schlüpferfolg und Mortalität	-	-				
Geschlechterverhältnis	0,1	0,5				
Überleben						
Missbildungen und Verhalten			-	-	-	-
Wachstum						
Körperlänge			-	-	-	-
Körpergewicht			-	-	-	-
Gonadenentwicklung und -differenzierung						
Reifegrade			0,1	0,5	< 0,1	0,1
Histopathol. Veränderungen						
Anzahl Effekte pro Tier			0,1	0,5	0,1	0,5
Proteinartige Flüssigkeit			0,5	1	-	-
Fibrose			0,1	0,5	-	-
Cysten (Atresie)			0,1	0,5	-	-
Abnahme Spermatozoen			-		0,1	0,5
Biochemische Parameter						
Vitellogenininduktion			0,5	1	0,1 (< 0,1)	0,5

Insgesamt sind somit die histopathologischen Ergebnisse der vorliegenden Studie durchaus mit anderen Studien vergleichbar, zumal nach Kenntnisstand der Autorin keine methodisch vergleichbaren histopathologischen Daten nach Testung mit ähnlich niedrigen Konzentrationen von EE2 existieren. Obwohl in manchen Studien vergleichbare Konzentrationen und auch vergleichbare Expositionsdesigns wie in der vorliegenden Studie getestet wurden, wurden bei den meisten Studien die LOECs zwischen 1 und 3 ng/L EE2 ermittelt (Balch et al., 2004; Segner, 2003; van den Belt et al., 2002). Somit liegt die LOEC in diesen Studien zwei bis sechsmal höher als in unserer aktuellen Studie.

Die Abnahme des VTG-Wertes nach Belastung mit 0,1 ng/L EE2 in der vorliegenden Studie ist ungewöhnlich. Hier wären weitere Untersuchungen mit niedrigen Konzentrationen von EE2 hilfreich.

Grist et al. (2003) fanden für die Populationswach-

tumsrate von Dickkopf-Elritzen (*Pimephales promelas*) eine NOAEC von 0,2 ng/L und eine LOAEC von 1,0 ng/L. Der geometrische Mittelwert dieser beiden Werte liegt bei rund 0,5 ng/L und stellt die populationsrelevante Wirkungsschwelle dar. Kuch et al. (2010) leiteten daraus eine vorläufige PNEC (*predicted no effect concentration*) von 0,3 ng/L ab.

SCHLUSSFOLGERUNG

Zur Ableitung einer PNEC aus der hier vorliegenden Studie ist ein Beurteilungsfaktor von 2 ausreichend, weil mit dem angewandten Test schon die empfindlichsten Endpunkte abgedeckt sind. So ergibt sich aus der empfindlichsten populationsrelevanten NOAEC (0,1 ng/L) eine PNEC von $0,1 / 2 = 0,05$ ng/L.

LITERATUR

- Balch GC, Mackenzie CA, Metcalfe CD. (2004): Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 alpha-ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(3), 782-791
- van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. (2001): Reproductive effects of ethinylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 458-467.
- van den Belt, K.; Wester, P. W., van der Ven, L. T. M., Verheyen, R.; Witters, H. (2002): Effects of ethinylestradiol on the reproductive physiology in Zebrafish (*Danio rerio*): Time dependency and reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(4), 767-775
- Chen L, Shen CF, Tang X, Chen C, Chen Y (2012): Estrogenic effects of dissolved organic matter and its impact on the activity of 17 α -estradiol. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 522-528
- Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C., Segner, H. (2005): An environmental relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(5), 1088-1098
- Grist EPM, Wells NC, Whitehouse P, Brighty G, Crane M (2003): Estimating the effects of 17 α -Ethinylestradiol on populations of the Fathead Minnow *P. promelas*: are conventional toxicological endpoints adequate? *Environ. Sci. Technol.* 37(8), 1609-1616
- Kuch B, Kern F, Metzger JW, von der Trenck KT (2010): Effect-related monitoring: estrogen-like substances in groundwater. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 250-260
- Maack, G. & Segner, H. (2004): Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139, 47-55
- Nash, J. P.; Kime, D. E.; van der Ven, L. T. M.; Wester, P. W.; Brion, F.; Maack, G.; Stahlschmidt-Allner, P.; Tyler, C. R. (2004): Longterm exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* 112 (17), 1725-1733
- OECD (2010): Fish sexual development test. Draft Guideline, Organization of Economic Cooperation and Development. www.oecd.org/data
- Örn, S., Yamani, S., Norrgren, L. (2006): Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between Zebrafish and Japanese Medaka after exposure to 17 α -ethinylestradiol and 17 α -trenbolone. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 237-243
- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A. (2003): Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: Report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302- 314
- Weber, L.P., Hill, J., Janz, D.M. (2003): Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquat. Toxicol.* 63, 44.

IMPRESSUM

HERAUSGEBER	LUBW Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg Postfach 10 01 63, 76231 Karlsruhe, www.lubw.baden-wuerttemberg.de
BEARBEITUNG	Dr. Susanne Knörr & Prof. Dr. Thomas Braunbeck, Universität Heidelberg, COS, Arbeitsgruppe Aquatische Ökotoxikologie, INF 504, 69120 Heidelberg. Für den Inhalt sind die Bearbeiter verantwortlich. Die geäußerten Interpretationen und Einschätzungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen. Originalbericht siehe Anhang.
AUFTRAGGEBER	Dr. Theo v. d. Trenck, LUBW, Referat Medienübergreifende Umweltbeobachtung, Klimawandel, 76231 Karlsruhe, theo.v.d.trenck@lubw.bwl.de
BEZUG	http://www.fachdokumente.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/91063/ ID Umweltbeobachtung U54-S04-N12
STAND	März 2012

Nachdruck und Verteilung für kommerzielle Zwecke – auch auszugsweise – ist nur mit Zustimmung des Herausgebers unter Quellenangabe und Überlassung von Belegexemplaren gestattet.