

**Aquatische Ökotoxikologie von Arzneimitteln**  
**Die reproduktionstoxische Wirkung von synthetischen Gestagenen**  
**am Fisch (*Pimephales promelas*)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**vorgelegt von**

**Diplom-Biologin**  
**Jana Zeilinger**

**Kiel 2009**



Referent: Prof. Dr. Edmund Maser  
Koreferent: Prof. Dr. Thorsten Reusch  
Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2009

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 13.01.2009

Der Dekan



## Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Edmund Maser für die Betreuung meiner Arbeit und bei Dr. Hermann Kruse für die Zusammenarbeit bedanken.

Dr. Reinhard Länge danke ich für die Vergabe des Themas, die jederzeit hilfsbereite und fachlich fundierte Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima. Bei Dr. Thomas Steger-Hartmann, Dr. Hermann Schweinfurth, Dr. Anna-Lena Frisk, Dr. Jakob Walter, Dr. Marian Raschke und Dr. Richardus Vonk bedanke ich mich für die ausführlichen Antworten auf viele Fragen und ihre Hilfsbereitschaft.

Außerdem gilt mein Dank der BSP AG für die finanzielle Unterstützung meines Projektes.

Der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie mit Mirco Klein, Michael Schmidt, Jana Lummert und Dr. Claudia Neubert habe ich drei ausgesprochen schöne, lustige und freundschaftliche Jahre zu verdanken. Besonders Mirco Klein hat mir bei allen „fischigen“ Details immer mit Rat und Tat unermüdlich zur Seite gestanden, während Claudia alle wissenschaftlichen Hochs und Tiefs und so manche externe Studie mit mir durchgestanden hat.

Bei der Pathologie mit Wolfram Melinat, Sabina Bassow, Lilo Markworth, Heidi Pirr, Monika Zielinski, Steven Neumeyer, Frank Kunze und Michaela Mann bedanke ich mich herzlich für die großartige Hilfe bei der Histologie und Immunhistochemie.

Jochen Hilbig möchte ich für sein Engagement für „sauberes“ Fischfutter danken.

Mein Dank gilt außerdem Ruth Wurf, Rita Rothenberger, Mareen Gottschalk, Margit Mallwitz, Marina Schmidt, Rainer Jarling und der PVP für die gute Zusammenarbeit und für Berichts-, SOP-, Prüfplan- sowie Kaffee-technische Unterstützung.

Ohne die Spielwiese und Mittagstruppe mit Wilma, Nicole Torno, Oliver Lüdtker-Handjery, Jan Göbes, Dr. Dörte Ahlbory-Dieker, Birgit Wendt, Samia Panczak, Thomas Naumann, Mirco Klein, Jana Lummert und Marco Jarzombek wäre so manches Problem wahrscheinlich nicht zu lösen gewesen.

## Kurzfassung

Estrogene Steroidhormone sind bekanntermaßen in der Lage, die Sexualentwicklung und die Reproduktion von Fischen schon in sehr niedrigen Konzentrationen zu beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu waren zu Beginn dieser Arbeit keine Daten zu den Umweltwirkungen der Klasse der Gestagene verfügbar. Synthetische Gestagene (Progestine) sind Bestandteile oraler Kontrazeptiva und Hormon-Ersatz-Therapeutika. Nach ihrer Anwendung wird der überwiegende Teil ausgeschieden und gelangt über den Urin in die aquatische Umwelt. Aufgrund ihrer pharmakologischen Aktivität beim Säuger ist anzunehmen, dass analog auch beim Fisch die Reproduktion den sensitivsten Endpunkt für die Wirkung von Progestinen darstellt. Um diese Annahme zu untersuchen, wurden die Effekte von drei zur Zeit vermarkteten Progestinen (Levonorgestrel, Dienogest und Drospirenon) an adulten Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) in Anlehnung an den Entwurf einer Prüfrichtlinie der OECD zum 21-Tage Fisch-Screening-Assay mit zusätzlichen Endpunkten wie Gonadenhistologie, Vitellogenin-Bestimmung mittels ELISA und Immunhistochemie untersucht. Die eingesetzten nominalen Konzentrationen ergaben sich aus einer rechnerischen Abschätzung der umweltrelevanten Konzentrationen auf Basis von Verkaufsdaten und bekannter akuter Toxizität am Fisch und unterschieden sich in der Größenordnung (Levonorgestrel 2-100 ng/L, Dienogest 100–1000 ng/L und Drospirenon 2–200 µg/L). Um zu überprüfen, ob sich noch andere Lebensphasen als sensitiv gegenüber Gestagenen erweisen, wurde mit einer der Modellsubstanzen (Levonorgestrel) ein Zwei-Generationen-Test nach einer US EPA Richtlinie durchgeführt, in dem die Tiere vom befruchteten Ei bis 30 Tage nach Schlupf der F<sub>1</sub>-Generation gegenüber der Testsubstanz exponiert wurden.

Alle getesteten Progestine verursachten im Reproduktionstest eine Hemmung der Eiablage und histologische Veränderungen an den Gonaden, unterschieden sich jedoch deutlich in Ihren Effektkonzentrationen. Levonorgestrel bewirkte ab der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,8 ng/L einen Stillstand der Reproduktion, so dass keine "No-observed-effect-concentration" (NOEC) identifiziert werden konnte. Höhere Konzentrationen (100 ng/L) resultierten in einer Maskulinisierung der weiblichen Fische mit einer Neubildung von Nuptialtuberkeln und dunklerer Pigmentierung von Haut und Flossen, männlichen sekundären Geschlechtsmerkmalen. Der Zwei-Generationen-Test zeigte, dass die Behandlung mit LNG das Geschlechterverhältnis verschiebt, so dass ab 22,0 ng/L am Expositionsende mehr als 90% der adulten Fische Männchen waren. Bei je einem Tier der Gruppen 22,0 und 29,7 ng/L wurden außerdem Hoden und Oocyten (Testes-Ova) gefunden. Dienogest bewirkte im Reproduktionstest ab einer gemessenen Konzentration von 293 ng/L aufwärts eine verringerte Anzahl der Eier pro Gelege und einen Rückgang der Anzahl abgelegter Eier in der höchsten Dosis. Die niedrigste Dosis von 65 ng/L zeigte keinen Effekt, so dass hier die NOEC festgelegt werden konnte. Die Behandlung mit DRSP sorgte erst ab einer Konzentration von 6,5 µg/L für einen Stillstand der Reproduktion der Fische mit einer klaren Dosis-Wirkungsbeziehung und einer NOEC von 0,66 µg/L. Die Effektkonzentrationen der drei Progestine unterscheiden sich deutlich in ihrer Größenordnung. Für die Effekte von LNG scheint maßgeblich der androgene Partialeffekt der Substanz verantwortlich zu sein, welcher vermutlich zu Beginn der Geschlechtsreife der Jungfische einsetzt. Die Abschätzung des PEC/PNEC-Verhältnisses anhand der ermittelten NOEC der drei Substanzen zeigte, dass für Drospirenon und Dienogest derzeit nicht mit einer Umweltgefährdung zu

rechnen ist, Levonorgestrel aber durchaus in wirksamen Konzentrationen in den Gewässern vorliegen kann.

## Abstract

Estrogenic steroidal hormones are known to be able to affect the sexual development and reproduction of fish at low concentrations. In contrast, no data on environmental effects of the class of progestogenic hormones are available yet. Synthetic gestagens (progestins) are a component in oral contraceptives and hormone replacement therapies. Upon their use, a fraction of the progestins will be excreted via urine into the aquatic environment. Based on their pharmacological action in mammals it is supposed that fish reproduction is the most sensitive endpoint for the progestin treatment. In order to test this assumption the effects of three progestins currently marketed in contraceptive formulations, levonorgestrel (LNG), dienogest (DNG) and drospirenone (DRSP), were investigated in adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) following a draft OECD test guideline on a 21-day fish screening assay with additional endpoints (histology, ELISA, immunohistochemistry). Furthermore, potential other sensitive life-stages were tested in a fish-full-life-cycle-test (FFLC) according to the US EPA guideline. For the 21-day assay, levonorgestrel was tested at nominal concentrations of 2-100 ng/L, dienogest at 100-1000 ng/L and drospirenone at concentrations of 2-200 µg/L. For the FFLC, 5-100 ng/L were administered during a whole life cycle (from freshly fertilized egg to sexually mature fish and F<sub>1</sub>).

All tested progestins caused an inhibition of reproductive success and histological changes at gonadal tissue. For levonorgestrel this occurred at concentrations of  $\geq 0.8$  ng/L and a NOEC could not be defined. Higher concentrations resulted in masculinization of females with de-novo-synthesis of nuptial tubercles. During the FFLC, a switch in the sex ratio appeared and the treatment resulted in >90% males on day 160 posthatch. At the two higher treatments, one fish per group developed testes-ova.

The reproductive effects of dienogest treatment occurred above a concentration of 65 ng/L (NOEC). Drospirenone treatment, on the other hand, affected the reproductive success of fathead minnow at concentrations of 6.5 µg/L and higher with a clear dose-response relationship and a NOEC of 0.66 µg/L, which is above environmentally relevant concentrations. The tested progestins showed clearly different effect concentrations. The androgenic partial effect of Levonorgestrel seemed to be responsible for the severe impact on the reproductive function, which is probably initiated at the sexual development phase.

Estimations of the PEC/PNEC-ratio using the experimentally determined NOEC of the three progestins were showing, that the environmental risk for DNG and DRSP is low, while LNG concentrations can reach relevant values for environmental impact.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| Kurzfassung .....                                                    | 5  |
| Abstract .....                                                       | 6  |
| Inhaltsverzeichnis .....                                             | 7  |
| 1 Einleitung .....                                                   | 10 |
| 1.1 Einsatz Synthetischer Hormone .....                              | 10 |
| 1.2 Die Dickkopfelnitze als Modellorganismus .....                   | 11 |
| 1.3 Die Reproduktion beim Fisch.....                                 | 12 |
| 1.3.1 Anatomie und Histologie des Ovars der Dickkopfelnitze .....    | 12 |
| 1.3.2 Anatomie und Histologie der Hoden der Dickkopfelnitze .....    | 15 |
| 1.3.3 Endokrine Steuerung der Teleostei .....                        | 17 |
| 1.3.3.1 Vitellogenese, Reifung und Ovulation.....                    | 18 |
| 1.3.3.2 Spermatogenese und Spermiation .....                         | 20 |
| 2 Problemstellung .....                                              | 21 |
| 3 Methoden .....                                                     | 22 |
| 3.1 Substanzen.....                                                  | 22 |
| 3.1.1 Levonorgestrel .....                                           | 22 |
| 3.1.2 Dienogest.....                                                 | 23 |
| 3.1.3 Drospirenon .....                                              | 24 |
| 3.2 Ökotoxikologische Tests.....                                     | 25 |
| 3.2.1 Zucht der Dickkopfelnitzen .....                               | 25 |
| 3.2.2 21-Tage Reproduktionstoxizitätstest am Fisch.....              | 25 |
| 3.2.2.1 Einsetzen der Tiere.....                                     | 26 |
| 3.2.2.2 Testbedingungen .....                                        | 27 |
| 3.2.2.3 Auswertung.....                                              | 29 |
| 3.2.2.4 Statistische Auswertung.....                                 | 30 |
| 3.2.3 Zwei-Generationen-Test ("Full-Life-Cycle-Test") am Fisch ..... | 31 |
| 3.2.3.1 Zuchtbedingungen .....                                       | 31 |
| 3.2.3.2 Einsetzen der Tiere.....                                     | 32 |
| 3.2.3.3 Testbedingungen .....                                        | 33 |
| 3.2.3.4 Auswertung.....                                              | 36 |
| 3.3 Gehaltsanalytik .....                                            | 37 |
| 3.3.1 Gehaltsanalytik Levonorgestrel .....                           | 37 |
| 3.3.2 Test System.....                                               | 38 |
| 3.3.3 LC-MS/MS Detektion .....                                       | 38 |
| 3.3.3.1 Validierung .....                                            | 39 |
| 3.3.4 Gehaltsanalytik Dienogest.....                                 | 39 |
| 3.3.5 Gehaltsanalytik Drospirenon.....                               | 40 |

|         |                                                                                                                          |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4     | Bestimmung des Hormongehaltes im Fischfutter mittels Transaktivierungstests in U-2 OS (humane Osteosarcoma) Zellen ..... | 41 |
| 3.4.1   | Transaktivierungstest für östrogene Agonisten und Antagonisten .....                                                     | 41 |
| 3.4.1.1 | Hormonbehandlung .....                                                                                                   | 43 |
| 3.4.1.2 | Lyse der Zellen .....                                                                                                    | 44 |
| 3.4.1.3 | Auswertung .....                                                                                                         | 45 |
| 3.5     | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....                                                                           | 45 |
| 3.5.1   | Eingesetzte Tiere .....                                                                                                  | 46 |
| 3.5.2   | Auswertung .....                                                                                                         | 47 |
| 3.6     | Histopathologie .....                                                                                                    | 47 |
| 3.6.1   | Vorsektion Histopathologie .....                                                                                         | 47 |
| 3.6.2   | Gonadenaufarbeitung der Fische .....                                                                                     | 48 |
| 3.6.3   | Schneiden /Färben .....                                                                                                  | 48 |
| 3.7     | Histomorphometrie .....                                                                                                  | 48 |
| 3.8     | Immunhistochemie.....                                                                                                    | 49 |
| 3.8.1   | Eingesetzte Tiere .....                                                                                                  | 50 |
| 3.8.2   | Antikörper .....                                                                                                         | 50 |
| 3.8.2.1 | Monoklonaler Maus-Anti-Fisch CYP1A- Antikörper .....                                                                     | 50 |
| 3.8.2.2 | Monoklonaler Maus-Anti-Karpfen-Vitellogenin- Antikörper .....                                                            | 51 |
| 3.8.2.3 | Monoklonaler Maus-Anti-Zebrafisch-Vitellogenin-Antikörper .....                                                          | 51 |
| 3.8.3   | Technik .....                                                                                                            | 52 |
| 3.8.3.1 | Gewebevorbehandlung.....                                                                                                 | 52 |
| 3.8.3.2 | Gebrauchslösungen.....                                                                                                   | 52 |
| 3.8.3.3 | Durchführung der proteolytischen Enzymverdauung.....                                                                     | 53 |
| 3.8.3.4 | Wärmevorbehandlung.....                                                                                                  | 54 |
| 3.8.3.5 | Verdünnung der primären Antikörper.....                                                                                  | 54 |
| 3.8.3.6 | Sekundärantikörper (Brückenantikörper).....                                                                              | 55 |
| 3.8.3.7 | Positive und negative Gewebekontrollen.....                                                                              | 55 |
| 3.8.3.8 | Durchführung des BSA-Nachweises (Horse-Reddish-Peroxidase HRP) ...                                                       | 56 |
| 4       | Ergebnisse .....                                                                                                         | 58 |
| 4.1     | Ökotoxikologische Tests.....                                                                                             | 58 |
| 4.1.1   | 21-Tage Reproduktionstoxizitätstest mit Levonorgestrel .....                                                             | 58 |
| 4.1.1.1 | Gehaltsanalytik Levonorgestrel.....                                                                                      | 58 |
| 4.1.1.2 | Abiotische Parameter.....                                                                                                | 59 |
| 4.1.1.3 | Reproduktionserfolg LNG .....                                                                                            | 59 |
| 4.1.1.4 | Gonadenhistologie LNG.....                                                                                               | 62 |
| 4.1.2   | Zwei-Generationen-Test mit Levonorgestrel .....                                                                          | 64 |
| 4.1.2.1 | Gehaltsanalytik .....                                                                                                    | 64 |



|         |                                                                    |     |
|---------|--------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.2.2 | Schlupferfolg .....                                                | 64  |
| 4.1.2.3 | Längen- und Gewichtsentwicklung .....                              | 66  |
| 4.1.2.4 | Reproduktionserfolg nach Erlangen der Geschlechtsreife.....        | 68  |
| 4.1.2.5 | Schlupferfolg der F <sub>1</sub> .....                             | 69  |
| 4.1.2.6 | Geschlechterverhältnis .....                                       | 69  |
| 4.1.3   | 21-Tage Reproduktionstoxizitätstest mit Dienogest .....            | 74  |
| 4.1.3.1 | Gehaltsanalytik Dienogest .....                                    | 74  |
| 4.1.3.2 | Abiotische Parameter.....                                          | 74  |
| 4.1.3.3 | Reproduktionserfolg Dienogest.....                                 | 74  |
| 4.1.3.4 | Gonadenhistologie Dienogest.....                                   | 77  |
| 4.1.4   | 21-Tage Reproduktionstoxizitätstest mit Drospirenon .....          | 79  |
| 4.1.4.1 | Gehaltsanalytik Drospirenon.....                                   | 79  |
| 4.1.4.2 | Abiotische Parameter.....                                          | 79  |
| 4.1.4.3 | Reproduktionserfolg Drospirenon .....                              | 79  |
| 4.1.4.4 | Gonadenhistologie Drospirenon .....                                | 81  |
| 4.2     | Bestimmung des Hormongehaltes im Fischfutter .....                 | 83  |
| 4.3     | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....                     | 84  |
| 4.4     | Immunhistochemie.....                                              | 87  |
| 5       | Diskussion.....                                                    | 94  |
| 5.1     | Gehaltsanalytik .....                                              | 94  |
| 5.2     | Reproduktions- und Entwicklungseffekte.....                        | 94  |
| 5.3     | Vitellogeninbestimmung mittels ELISA und Immunhistochemie.....     | 98  |
| 5.4     | Mechanismus der Toxizität.....                                     | 100 |
| 5.5     | Vergleich der drei Progestine und Umweltrelevanz der Befunde ..... | 102 |
| 6       | Literaturverzeichnis .....                                         | 105 |
| 7       | Anhang.....                                                        | 112 |
| 7.1     | Abbildungsverzeichnis .....                                        | 112 |
| 7.2     | Tabellenverzeichnis .....                                          | 115 |
| 7.3     | Abkürzungsverzeichnis.....                                         | 116 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Einsatz Synthetischer Hormone

Ein wichtiges Forschungsgebiet der Umwelttoxikologie sind Substanzwirkungen, die das Hormonsystems von Organismen betreffen. Das endokrine System dient Tieren neben dem Immun- und Nervensystem dem Austausch von Informationen zwischen der Umwelt und dem Organismus sowie zwischen verschiedenen Ebenen im Körper des Individuums. Es steuert wichtige physiologische Prozesse wie Metabolismus, Osmoregulation, Reproduktion, Verhalten und Entwicklung und sorgt für die langfristige Aufrechterhaltung der Homöostase. Die interzellulären Botenstoffe hierfür sind lipophile Hormone, die schon in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen wirksam sind.

Die meisten Studien zu endokrin aktiven Substanzen in der Umwelt befassen sich mit Verweiblichungseffekten, die in vielen Wirbeltierklassen durch den Einfluss von estrogenartig wirkenden Chemikalien unterschiedlicher Herkunft (Xenoestrogene) auftreten. Derartige Chemikalien sind in der Umwelt ubiquitär verbreitet [1]. Darüber hinaus sind jedoch auch synthetische oder natürliche Stoffe bekannt, die als Estrogene, Antiestrogene, Androgene, Antiandrogene oder Substanzen, die das Schilddrüsensystem beeinflussen, wirken [2-9]. Die chemischen Strukturen der synthetischen Stoffe sind vorwiegend analog der natürlichen Steroide und Schilddrüsenhormone stark lipophil.

Synthetische Geschlechtshormone wie Estrogene und Gestagene werden weit verbreitet in oralen Kontrazeptiva und in der Hormonersatztherapie (HRT) eingesetzt und können über Abwässer in die aquatische Umwelt gelangen. Es wurde vielfach gezeigt, dass Estrogene schon in niedrigen Konzentrationen in der Lage sind, bei Langzeit-Exposition die sexuelle Entwicklung und Reproduktion von Fischen zu stören und eine Feminisierung von männlichen Fischen zu verursachen [10-13]. Die Kenntnis der Umweltwirkungen von Gestagenen ist hingegen gering, obwohl diese eine wichtige Klasse der pharmazeutisch aktiven Stoffe in Hormonpräparaten darstellen.

Beim Menschen spielt das natürliche Progesteron eine wichtige Rolle in der Regulation der Eireifung und Schwangerschaft, vermittelt über eine Bindung an den Progesteronrezeptor (PR). Synthetische Gestagene (Progestine) hemmen effektiv die Ovulation und die Proliferation des Endometriums und werden aufgrund dieser Eigenschaften zur hormonellen Empfängnisverhütung eingesetzt. Desweiteren werden Progestine zur Vorbeugung von estrogen-induzierter endometrieller Hyperplasie im Rahmen der HRT eingesetzt [14]. Die verschiedenen vermarkteten Progestine variieren im Hinblick auf die Interaktion mit anderen Hormonrezeptoren, abhängig von der molekularen Kernstruktur, von der sie gewonnen wurden (Progesteron, Testosteron oder Spironolacton) [15;16].

Derivate von 19-Nortestosteron (Gonan- [Levonorgestrel], und der Estran-Gruppe [Norethisteron]) zeigen eine androgene Aktivität, während Derivate von 19-Norprogesteron (Pregnane und Norpregnane) weniger mit anderen Steroidrezeptoren als dem Progesteronrezeptor interagieren. Allerdings haben die 17-Hydroxyprogesteron-Derivate Cyproteronacetat und Medroxyprogesteronacetat potente anti-androgene oder leichte androgene Wirkung [15]. Drospirenon, ein Derivat von Spironolacton, besitzt eher ein anti-mineralcorticoide und ein leicht anti-androgenes Profil [16].

Die Rolle des endogenen Progesterons in Fischen wurde in zahlreichen Studien untersucht. Progesteron ist ein wichtiger Mediator des Oocytenwachstums und der Reifung sowie in der Spermatogenese und Spermienreifung bei Fischen [17;18]. Das weitaus wichtigste Progesteron im Fisch ist  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-on ( $17\alpha,20\beta$ -DP), welches bei der Umwandlung von  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron unter Einfluss von Gonadotropinen aus der Hypophyse entsteht. Ob es eine Kreuzreaktivität von Progestinen beim Fisch gibt, ist nicht bekannt, da die Wirkung synthetischer Gestagene auf die Organismengruppe bisher kaum untersucht wurde. Hormonpräparate haben einen 3-100 mal höheren Gehalt an Progestinen als an Estrogenen, abhängig von der Formulierung und therapeutischen Anwendung. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Umweltkonzentrationen von Progestinen, die durch humane Exkretion verursacht wurden, mindestens in einem ähnlichen wahrscheinlich sogar höheren Bereich liegen als die von Estrogenen (wenige ng/L in Kläranlagenabläufen, sub-ng/L Konzentrationen in Oberflächengewässern). Obwohl kaum Daten zu Abbaubarkeit und Umweltkonzentrationen von Progestinen vorhanden sind, wird angenommen, dass diese in der Größenordnung um einige ng/L vorliegen. Medroxyprogesteron wurde in Abwasserproben bis zu 15 ng/L detektiert, während in Oberflächengewässern 1 ng/L gefunden wurde [19;20].

## 1.2 Die Dickkopfritze als Modellorganismus

Organismen, die einen Großteil ihres Lebens im Wasser verbringen, können intensiv gegenüber Schadstoffen exponiert sein, deren Verbreitung in die Umwelt über die Oberflächengewässer erfolgt. Aquatische Organismen wie Fische sind daher besonders gefährdet, [7;21-24] und bieten ein gutes Modell, um die Effekte dieser Stoffe auf die reproduktive Funktion von Wirbeltieren in der Umwelt zu untersuchen [25].

Die Dickkopfritze (*Pimephales promelas*) findet als Vertreter der wichtigen Familie der Karpfen (*Cyprinidae*) breiten Einsatz in den ökotoxikologischen Standard-Testverfahren [4;11;26-33] und stellt einen sensitiven Modellorganismus dar, um Umweltwirkungen auf die reproduktive Funktion beim Fisch zu bestimmen. Im Gegensatz zu aquatischen Invertebraten

ist die endokrine Steuerung der Reproduktion beim Fisch gut untersucht, die auch Parallelen zum Säuger aufweist (siehe Kap.1.3) [17;18;31]. Die Zucht, Haltung und die Exposition gegenüber Substanzen ist unter Laborbedingungen einfach und praktikabel. Die Fischart verfügt über kurze Reproduktions-Zyklen und produziert regelmäßig eine große Anzahl an Gameten, die auf Veränderungen (Befruchtung, Fehlbildungen, Schlupfraten) untersucht werden können. Unter optimalen Bedingungen ( $25\pm 1$  °C, 16/8 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus) können Weibchen über längere Perioden alle drei bis fünf Tage ein Gelege mit ca. 50-200 Eiern ablegen [4]. Die befruchteten Eier können dann nach dem Schlupf in 4-5 Monaten die Geschlechtsreife erreichen [31], so dass auch chronische Effekte und Auswirkungen der Exposition auf die folgenden Generationen untersucht werden können. Da Männchen und Weibchen einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus haben, können anhand der Veränderungen der sekundären Geschlechtsmerkmale auch Effekte auf die Geschlechtsentwicklung unterschieden werden.

### 1.3 Die Reproduktion beim Fisch

#### 1.3.1 Anatomie und Histologie des Ovars der Dickkopfelritze

Die Ovarien sind paarige, längliche Strukturen, die beidseitig dorsal in der Körperhöhle liegen (Abb. 1.1). Im Ovar befinden sich entodermale Oogonien, Oocyten und unterstützendes Stromagewebe sowie Gefäße und Nerven.

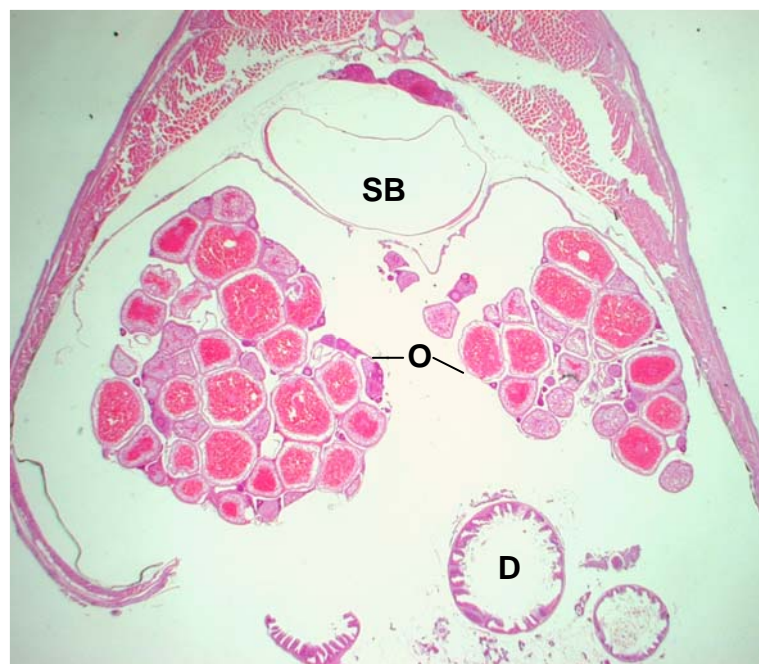


Abbildung 1.1: Ganzkörperquerschnitt einer weiblichen Dickkopfelritze (Vergrößerung x 2,5, Kontrolltier aus Reproduktionstest, siehe Kap. 3.2.2). O= Ovar, SB= Schwimmblase, D= Darmanschnitte.

Die Eizellen (Oocyten) entwickeln sich aus mitotisch teilenden Zellen des Keimepithels und sind von ovariellen Follikelzellen umgeben, die sich während der Entwicklung und Reifung der Oocyte zu einer inneren Follikelzellschicht (Granulosa) und einer äußeren Hülle aus Stromagewebe (Theca) ausbilden und durch eine Membran getrennt sind (Abb. 1.2). Bei den Dickkopfelnritzen, die je nach äußeren Bedingungen auch dauerhaft laichbereit sind, sind in den Ovarien immer Oocyten unterschiedlicher Reifestadien vorhanden. Der Anteil der jeweiligen Stadien kann ja nach dem Zeitpunkt des letzten Abblaus schwanken.

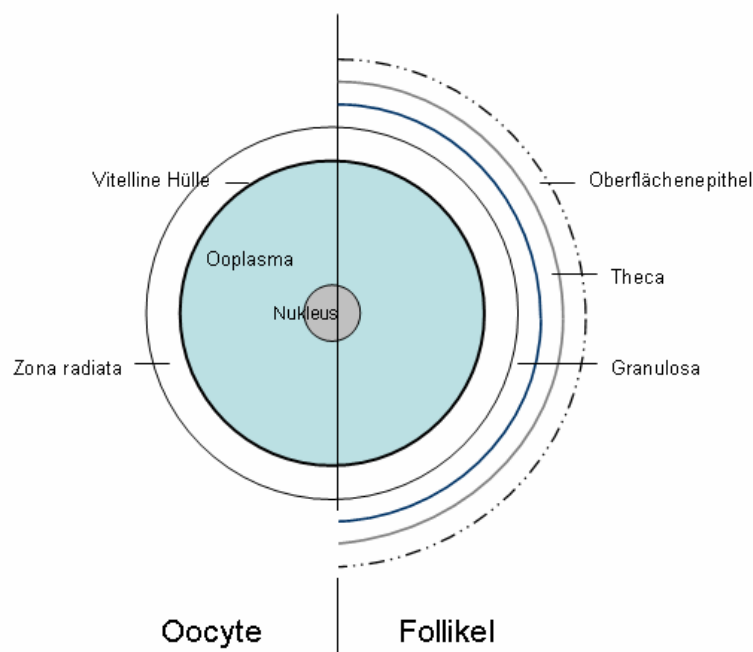


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer Oocyte und dem intakten ovariellen Follikel. Nach Tyler & Sumpter, 1996 [34] und Arukwe & Goksør, 2003 [35].

Die Entwicklung der Oocyten verläuft bei allen Teleostei (echte Knochenfische) in ähnlichen Wachstumsphasen [35;36], die in sechs Perioden differenziert werden können: Oogenese, primäres Oocytenwachstum, Cortical-alveoläres Stadium, Vitellogenese, Reifung und Ovulation. Bei asynchron laichenden Fischen wie den Dickkopfelnritzen können im Ovar mehrere Perioden gleichzeitig ablaufen [34]. Im folgenden sind diese Entwicklungsschritte dargestellt [34-36]:

- 1.) Primäre Wachstumsphase: Zu Beginn des primären Oocytenwachstums findet eine intensive RNA-Synthese und eine Zunahme des Cytoplasmas statt, während sich eine vitelline Hülle (Chorion) um die Oocyten bildet. Die Oocyten haben zu diesem Zeitpunkt die erste meiotische Teilung abgeschlossen und liegen in einem Nest mit Oocyten der gleichen Entwicklungsstufe. Zum Ende der primären Wachstumsphase wandern sie aus der Nest-Region aus und treten in die folliculäre Phase ein, in der sich die Zona radiata verdickt und sich die Schichten der Steroidhormonproduzierenden Granulosa- und Thecazellen bilden, die für die spätere Vitellogenese wichtig sind.
- 2.) Cortical-alveoläre Phase: In dieser Phase sind die mit Glykoproteinen gefüllten, corticalen Alveolen als cytoplasmatische Strukturen lichtmikroskopisch zu erkennen und füllen gegen Ende der Phase das Cytoplasma der Oocyte nahezu aus. Die Glykoproteine dienen dazu, die Eihülle nach der Ovulation zu härten und ein Eindringen mehrerer Spermien zu verhindern. Die Synthese der Alveolen sorgt für eine Volumenvergrößerung der Oocyte um ein Vielfaches. Es können auch schon erste Lipideinschlüsse zu erkennen sein.
- 3.) Vitellogenese: Während dieser Reifephase findet durch die Einlagerung des Dotter(Vorläufer-)proteins Vitellogenin ein enormer Größenzuwachs der Oocyte statt. Vitellogenin ist bei allen Teleostei ein Glycolipophosphoprotein mit großem Molekulargewicht (300-640 kDa) und wird als Antwort auf das vom Ovar ins Blut abgegebene Estradiol-17 $\beta$  in der Leber gebildet. Die Aufnahme in die Oocyten erfolgt über eine Rezeptor-vermittelte Endocytose in die Dottervakuolen, während die Corticalalveolen zur Peripherie gedrückt werden.
- 4.) Reifung der Oocyten: Der Nukleus (Keimbläschen) wandert zur Peripherie der Zelle in Richtung der Micropyle. Die Proteinaufnahme in die Oocyten dauert während der Reifung noch an, doch kommt zum Zeitpunkt des Keimbläschen-Untergangs ("germinal vesicle breakdown", GVBD) abrupt zum Ende. Damit geht die zweite meiotische Teilung weiter, die nach der Befruchtung abgeschlossen ist.

Die Degeneration von präovulatorischen Oocyten (Atresie) kann in allen Entwicklungsstadien vieler Wirbeltiere auftreten und wird als normaler Prozess angesehen, um die Anzahl der rekrutierten und heranreifenden Eizellen zu regulieren [34]. Bei einigen Fischarten tritt eine Atresie hingegen nur unter suboptimalen Bedingungen wie mangelnder Fütterung auf. Nach dem Eintritt der Oocyte in das cortical-alveoläre Stadium wird Atresie hingegen nicht mehr als physiologischer Mechanismus zur Kontrolle der Fruchtbarkeit angesehen, sondern

resultiert eher aus umweltbedingten Stressfaktoren [34], ausgelöst durch einen ausbleibenden Anstieg von Gonadotropin-II [37].

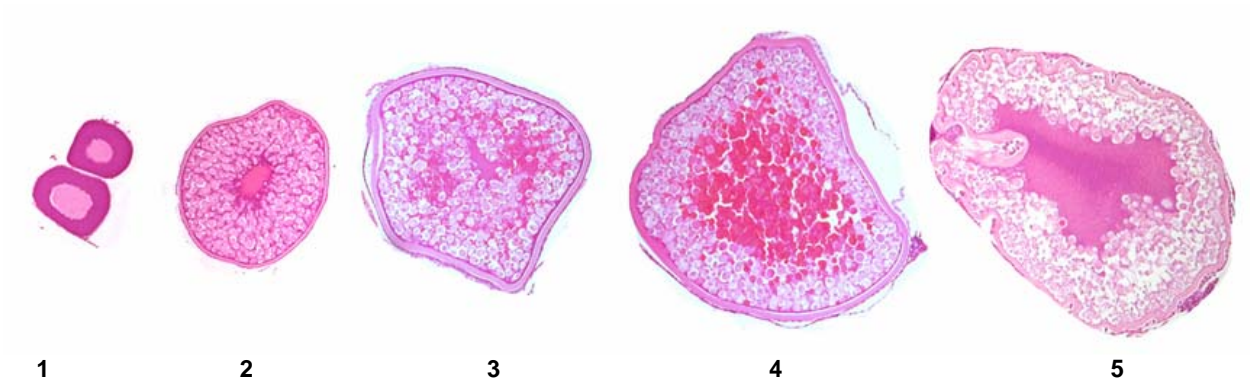


Abbildung 1.3: Oocytenstadien einer Dickkopfritze (Vergrößerung x 40, Kontrolltier aus Reproduktionstest, siehe Kap. 3.2.2). 1. Primäre Oocyten; 2.+3. Prävitellogene Oocyte; 4. Vitellogene Oocyte; 5. Atretische Oocyte.

### 1.3.2 Anatomie und Histologie der Hoden der Dickkopfritze

Die Hoden (Testes) der Dickkopfritze sind ähnlich den Ovarien paarig angelegte, längliche Strukturen vom lobulären Typ, die dorsal in der abdominalen Körperhöhle verlaufen (Abb. 1.5). Im Inneren bilden die Hodentubuli (Tubuli seminiferi) ein Netzwerk, in denen sich die Spermatogonien innerhalb von Spermatocysten entwickeln. Diese werden von Sertolizellen gebildet und beinhalten jeweils immer Zellen des gleichen Reifegrades [18;38] (Abb. 1.4). Die reifen Spermien in den Hodentubuli werden von den Samenleitern aufgenommen und zur Genitalpapille geleitet. Im interstitiellen Gewebe zwischen den Tubuli befinden sich Blut- und Lymphgefäße, Fibroblasten und Leydig-Zellen, die als der Ort der Steroidsynthese in den Hoden angesehen werden [38].

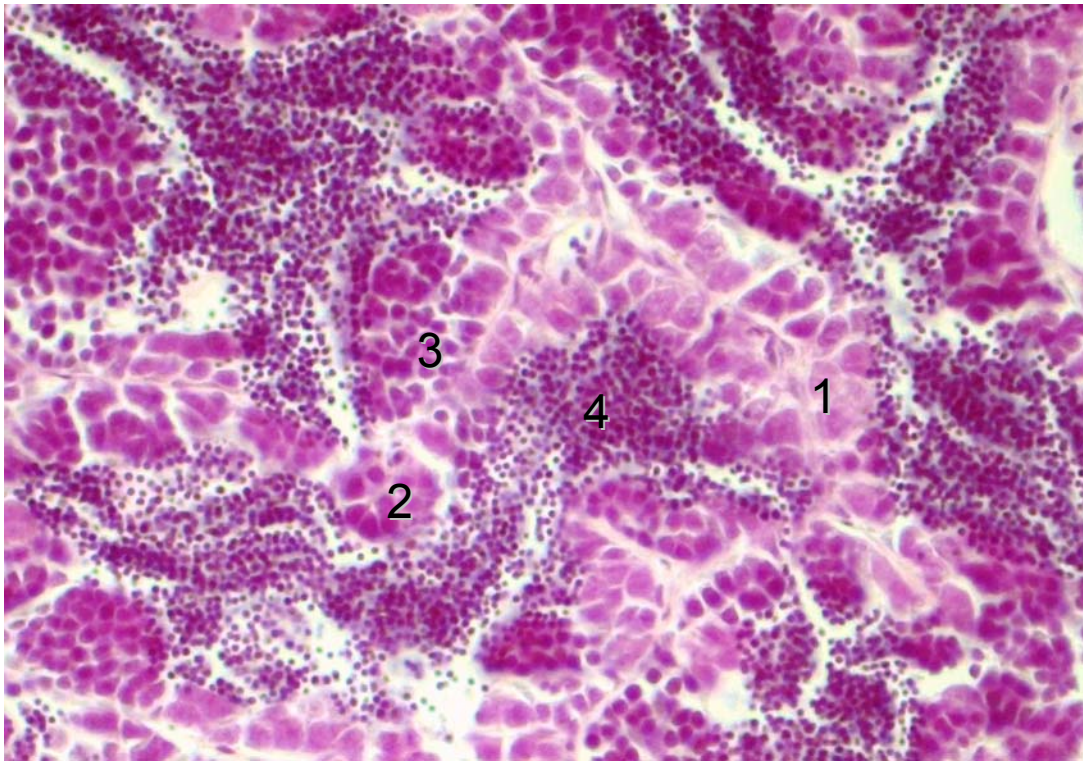


Abbildung 1.4: Hoden einer Dickkopfelritze, Querschnitt (Vergrößerung x 40, (Kontrolltier aus Reproduktionstest, siehe Kap. 3.2.2). Spermazysten mit 1. Spermatogonien; 2. primären Spermatocyten; 3. Sekundären Spermatocyten; 4. reifen Spermatozoen im Tubuluslumen.

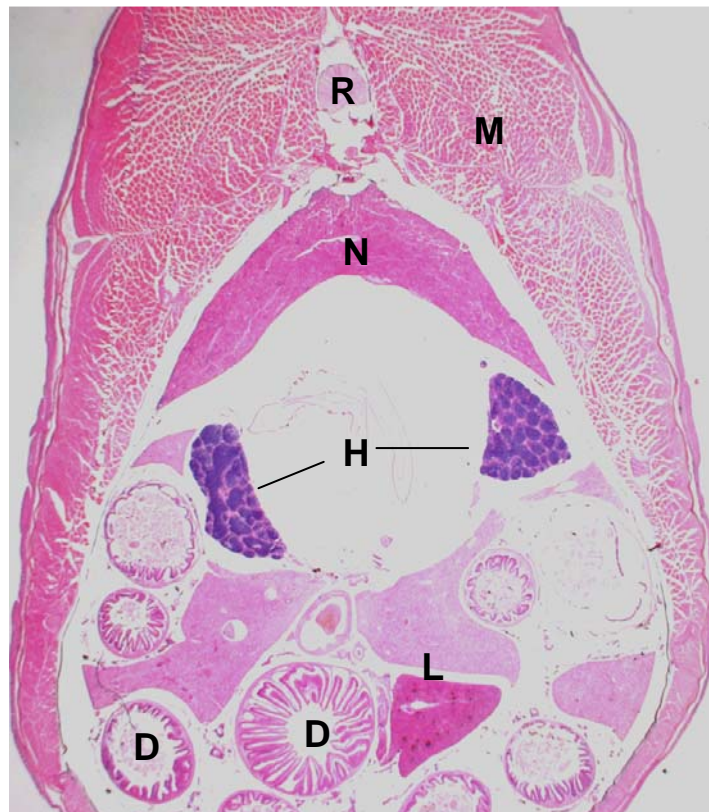


Abbildung 1.5: Ganzkörperquerschnitt einer männlichen Dickkopfelritze (Vergrößerung x 2,5, (Kontrolltier aus Reproduktionstest, siehe Kap. 3.2.2). H= Hoden, L= Leber, D= Darmanschnitte, N= Niere, M=Muskulatur, R= Rückenmark.



### 1.3.3 Endokrine Steuerung der Teleostei

Das endokrine System spielt eine essentielle Rolle in der Regulation metabolischer Prozesse wie Ernährung, Wachstum, Verhalten und Reproduktion und reagiert auf Stress und Veränderungen. Sowohl eine hyper- als auch hypoaktive Hormonsekretion führt unweigerlich zu Veränderungen der Funktionen der Organsysteme, so dass die Einflüsse von extern aufgenommenen endokrin-aktiven Substanzen aus der Umwelt erheblich in das hormonelle Gleichgewicht eingreifen können [39].

Ähnlich der endokrinen Regulation im Säuger involviert die Ausschüttung von Hypophysen-Hypothalamus- und Gonadenhormonen sowie deren Inaktivierung in der Leber eine komplexe Interaktion von internen und externen Stimuli (Abb.1.6). Diese kann durch chemische Kontaminationen der aquatischen Umwelt gestört werden [17;39-41]. Die Produktion von Gameten in den Gonaden unterliegt einer Regulation, an der externe Stimuli wie die Temperatur, Photoperiode und das Wetter beteiligt sind, und sich auf die Ausschüttung des "Gonadotropin releasing hormone" (GnRH) im Hypothalamus auswirken. GnRH bewirkt dann eine Ausschüttung der Gonadotropine (GtH-1 und -2, vergl. FSH/LH beim Säuger) in der Hypophyse, welche die Gonadenentwicklung und die Produktion der Steroidhormone anregen [18]. Bei den meisten Fischen ist 11-Ketotestosteron (11-KT) das wichtigste Androgen, während auch beim Fisch Estradiol-17 $\beta$  (E2-17 $\beta$ ) das ovarielle Estrogen darstellt. Die Wirkung des Estradiol-17 $\beta$  im Fisch unterscheidet sich aber deutlich von der im Säuger: das Hauptzielorgan ist die Leber, wo es die Produktion des Dotter-Vorläuferprotein Vitellogenin (VTG) stimuliert. Vitellogenin gelangt über das Blut ins Ovar, wo es unter dem Einfluss von GtH-1 in die Ovarien inkorporiert und in die Dotterproteine Phosphitin und Vitellin gespalten wird. Die Produktion des Dotterproteins in der Leber kann auch bei männlichen Fischen durch natürliche oder synthetische Estrogene induziert werden, da sie ebenfalls Träger des Vitellogenin-Gens sind [12;13;42].

Ist die Gametenproduktion abgeschlossen, geht die Sekretion von E2-17 $\beta$  und 11-KT zurück und die Synthese wechselt zu einem Progestogen (17,20  $\beta$ -Dihydroxy-4-Pregnen-3-on, 17,20 $\beta$ -DP), welches die Reifung der Oocyten und der Spermien induziert [34;38]. Die finale präovulatorische Oocytenreifung erfolgt über die Stimulation des Keimvesikel-Untergangs ("germinal vesicle breakdown", GVBD) [43]. Die Gonaden signalisieren dem Hypothalamus und der Hypophyse ihren Status in einem Feedback über die synthetisierten Hormone und Inhibine zurück.

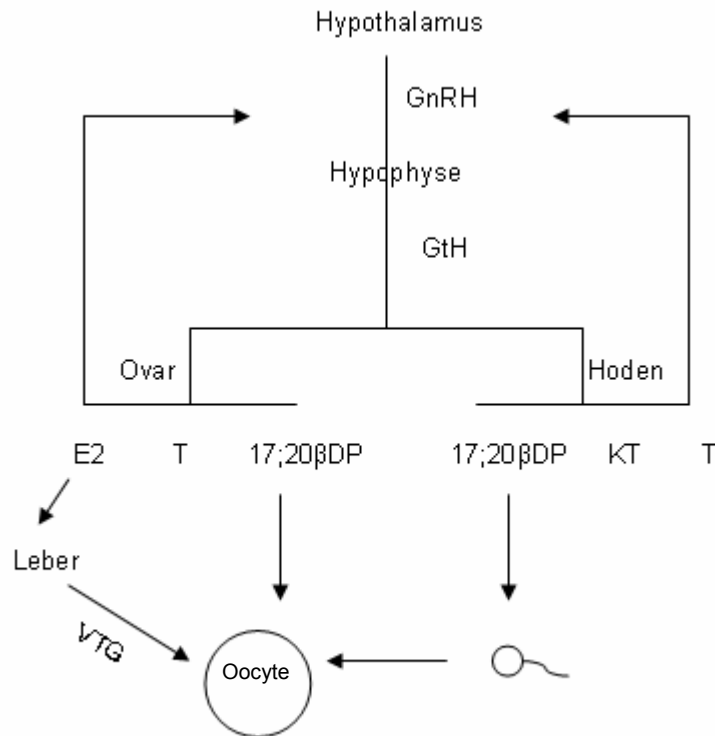


Abbildung 1.6: Endokrine Regulation beim Fisch. E2= Estradiol-17β; GnRH= "Gonadotropin releasing hormone"; GtH= Gonadotropin; KT= 11-Ketotestosteron; T= Testosteron; 17,20β-DP= 17,20β-Dihydroxy-4-Pregnen-3-on; VTG= Vitellogenin. Nach Kime, 1999 [17].

Xenobiotika können also auf verschiedenen Ebenen der endokrinen Steuerung (Hypophyse/Hypothalamus, Hormonproduktion in den Gonaden, Deaktivierung der Hormone in der Leber, MFO-Aktivität, Gametenentwicklung, -reifung, sexuelle Differenzierung) eingreifen und diese beeinträchtigen. Eine Reihe von chemischen Stoffen besitzen selber eine hormonelle Aktivität, so dass sie auch direkt die Gametenentwicklung und damit die Fertilität stören können ("endocrine disruptors"). Diese Wirkung kann bereits bei Konzentrationen auftreten, bei denen die sonstige Gesundheit des Fisches nicht beeinträchtigt sein muss.

### 1.3.3.1 Vitellogenese, Reifung und Ovulation

Während der Vitellogenese wird in der Leber unter dem Einfluss von E2-17β das Dottervorläuferprotein Vitellogenin produziert, ins Blut abgegeben und von dort selektiv von den Oocyten aufgenommen. Bei den meisten Fischarten wird für die Bereitstellung des folliculären E2-17β ein Zwei-Zelltypen-Modell beschrieben: die Theca-Schicht gibt unter dem Einfluss von Gonadotropinen ein Androgen (Testosteron) ab, welches in die Granulosazellen diffundiert und dort zu Estradiol aromatisiert wird [18] (Abb.1.7).

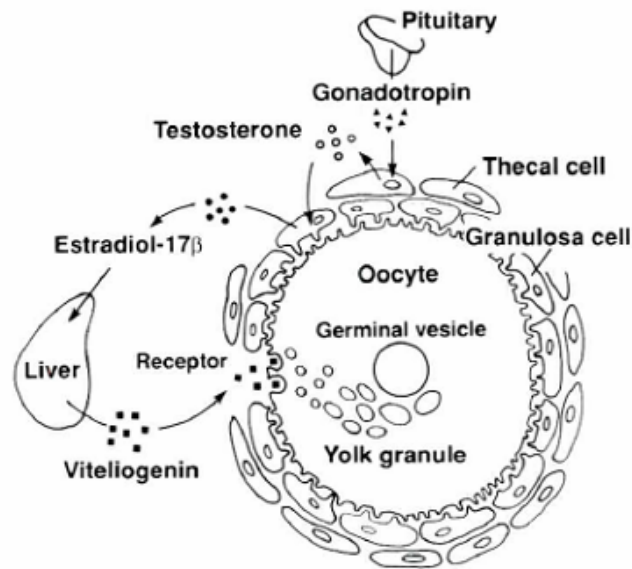


Abbildung 1.7: Hormonelle Regulation des Oocytenwachstums (Vitellogenese) beim Fisch. Nagahama (1994) [18].

Die Oocyte muss während der Reifungsphase die meiotischen Teilungen abschließen, um die erfolgreiche Befruchtung vorzubereiten. Dieser Prozess wird indirekt von Gonadotropin über eine Stimulierung der Follikelzellen induziert: der sekundäre Mediator der Oocytenreifung ist 17,20 $\beta$ -DP ("Maturation inducing Hormone", MIH), welches auch von einem Zwei-Zelltypen-Modell bereitgestellt wird. Die Theca-Zellen produzieren 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron, welches über die Basallamina in die Granulosa-Zellen gelangt und dort unter dem Einfluss von Gonadotropin von der 20 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu 17,20 $\beta$ -DP konvertiert wird und den Untergang des Keimvesikels (GVBD) auslöst. Der tertiäre Mediator der Reifung ist MPF ("Maturation promoting factor"; ein Komplex aus cdc2-Kinase und Cyclin B), welcher den Zellzyklus und die Reifeteilungen stimuliert. Die Ovulation wird von Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF) durch die Kontraktion der Follikelwand und die Aktivierung von proteolytischen Enzymen induziert.

### 1.3.3.2 Spermatogenese und Spermiation

Die Spermatogenese findet in den testikulären Spermazocysten statt. Unter dem Einfluss von Gonadotropinen produzieren die somatischen Leydig-Zellen 11-Ketotestosteron und stimulieren über eine Aktivin B-Ausschüttung in den Sertoli-Zellen die Proliferation der Spermatogonien. Diese treten nach etwa 10 mitotischen Teilungen in die Meiose ein. Nach zwei meiotischen Teilungen und der Abgabe in die Samenleiter sind die Spermatozoen aufgrund ihrer fehlenden Motilität noch infertil.

Bei Einsetzen der Spermiation wechselt die steroidogene Produktion zu 17,20 $\beta$ -DP, welches die finale Spermienreifung stimuliert. 17,20 $\beta$ -DP wird in den Spermien selbst aus einem Vorläufersteroid (17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron) gebildet, welches von den somatischen Zellen unter Gonadotropin-Einfluß bereitgestellt wird. Im Samenleiter sorgt 17,20 $\beta$ -DP für einen Anstieg des pH-Wertes, der dann in den Spermien einen Anstieg des cyclischen Adenosinmonophosphates (cAMP) bewirkt, was für die Motilität der Spermien sorgt (Abb.1.8) [18;44].

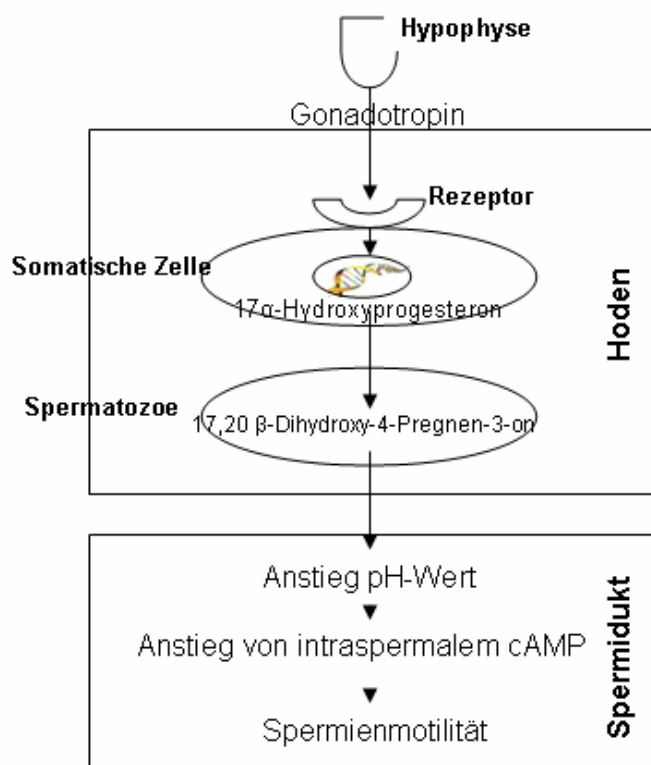


Abbildung 1.8: Hormonelle Regulation der Spermienmotilität bei Salmoniden. Nach Nagahama, 1994 [18].

## 2 Problemstellung

Die Effekte von synthetischen Gestagenen, denen Fische in der aquatischen Umwelt ausgesetzt sind, wurden bisher noch nicht beschrieben. Die Untersuchungen zur Wirkung synthetischer Hormone beim Fisch beschränken sich bisher auf Estrogene, Androgene und deren Antagonisten [4;45-47]. Als Arbeitshypothese wird auf Basis der hormonalen Wirkungen beim Säuger angenommen, dass gegenüber Progestinen exponierte Fische primär Effekte auf die Gametenreifung zeigen sollten, dass also die Fertilität und Fortpflanzungsfähigkeit (reproduktive Endpunkte) gestört sein könnten.

Um die Relevanz der beim Säuger beschriebenen pharmakologischen Eigenschaften auch bei aquatischen Vertebraten abzuschätzen, wurden drei verschiedene Progestine auf ihre reproduktionstoxische Wirkung am Fisch getestet. Zusätzlich wurde mit dem Modellgestagen Levonorgestrel eine Prüfung durchgeführt, während der die Fische vom befruchteten Ei über den gesamten Lebenszyklus bis zur zweiten Generation ( $F_1$ ) gegenüber der Testsubstanz exponiert wurden. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit Parameter wie Schlupf und Wachstum beeinträchtigt werden und zusätzliche Effekte auf die Entwicklung der Fische, welche den Reproduktionserfolg beeinflussen können, erfasst werden.

Levonorgestrel (LNG;  $17\beta$ -Hydroxy-18-methyl-19-nor- $17\alpha$ -pregn-4-en-20-yn-3-on) ist ein Derivat von 19-Nortestosteron und hat eine geringe Affinität zum Androgenrezeptor (AR) sowie einen androgenen Partialeffekt [48]. Im Gegensatz dazu hat Dienogest (DNG;  $17\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-19-norpregna-4,9-dien-21-nitril) als ein Hybrid der Estran-Gruppe mit einem Cyanomethyl-Radikal eine antiandrogene Aktivität [15]. Drospirenon (DRSP;  $6\beta,7\beta;15\beta,16\beta$ -Dimethylen-3-oxo- $17\alpha$ -pregn-4-en-21,17-carbolacton) hat als ein Derivat von  $17\beta$ -Spironolacton eine antimineralcorticoide und eine leichte antiandrogene Aktivität [49] und ein mit dem endogenen Progesteron vergleichbares pharmakodynamisches gestagenes Profil [50;51].

### 3 Methoden

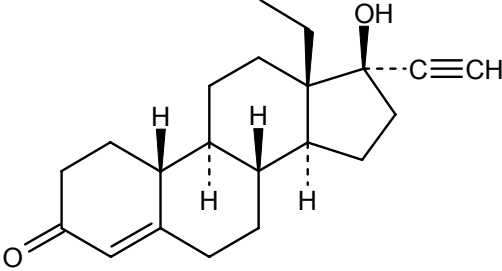
#### 3.1 Substanzen

Synthetische Gestagene (Progestine) finden Verwendung in vielen Präparaten zur Empfängnisverhütung (orale Kontrazeptiva) und in der Hormonersatztherapie (HRT). Sie unterdrücken beim Säuger reversibel die Proliferation des Endometriums und damit das Einnisten einer befruchteten Eizelle und verhindern im Rahmen der HRT wirksam die estrogen-induzierte endometrielle Hyperplasie.

Nachfolgend sind die drei Testsubstanzen mit ihrer Struktur, chemischen (IUPAC-) Namen, Molekulargewicht, Wasserlöslichkeit,  $\log_{POW}$  und Reinheit aufgeführt. Alle Testsubstanzen wurden von der Bayer Schering Pharma AG, (Berlin/D) hergestellt.

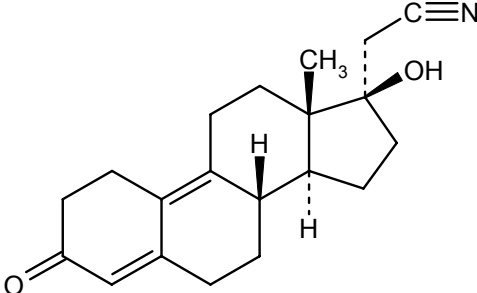
##### 3.1.1 Levonorgestrel

Tabelle 3.1.: Substanzeigenschaften Levonorgestrel

|                                                                                                         |                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Chemische Bezeichnung:<br>(-)-13-Ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17 $\alpha$ -pregn-4-en-20-yn-3-one       |                                     |
| CAS-Nr:<br>797-63-7                                                                                     | Generischer Name:<br>Levonorgestrel |
| Strukturformel:<br> |                                     |
| Molekulargewicht: 312.46                                                                                |                                     |
| Wasserlöslichkeit= 1.33 mg/L bei pH 6.8; $\log_{POW}$ = 4,86                                            |                                     |
| Reinheit: 100%                                                                                          |                                     |

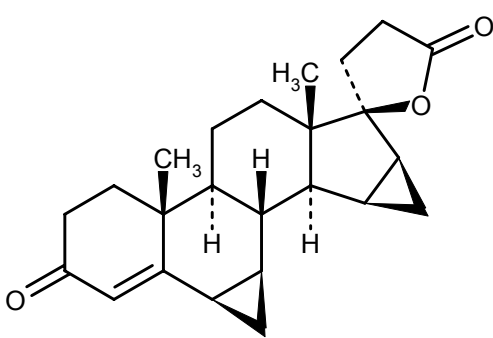
### 3.1.2 Dienogest

Tabelle 3.2: Substanzeigenschaften Dienogest

|                                                                                                       |                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Chemische Bezeichnung:<br>17 $\alpha$ -Cyanomethyl-17 $\beta$ -hydroxy-4,9-estradien-3-one            |                                |
| CAS-Nr.<br>65928-58-7                                                                                 | Generischer Name:<br>Dienogest |
| Strukturformel:<br> |                                |
| Molekulargewicht: 311.43                                                                              |                                |
| Wasserlöslichkeit= 25.7 mg/L bei 20°C; log <sub>POW</sub> = 1,6                                       |                                |
| Reinheit: 99.94%                                                                                      |                                |

### 3.1.3 Drospirenon

Tabelle 3.3: Substanzeigenschaften Drospirenon

|                                                                                                                                       |                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Chemische Bezeichnung:<br>6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dimethylene-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-ene-21,17-carbolactone |                                   |
| CAS-Nr.<br>67392-87-4                                                                                                                 | Generischer Name:<br>Drospirenone |
| Strukturformel:<br>                                 |                                   |
| Molekulargewicht: 366.50                                                                                                              |                                   |
| Wasserlöslichkeit= 9.41mg/L ( $T_{1/2}$ =12,8 Tage bei 25°C, pH 7); $\log_{POW}$ = 3,08                                               |                                   |
| Reinheit: 99.63%                                                                                                                      |                                   |



## 3.2 Ökotoxikologische Tests

Für die Untersuchung der Wirkung der verschiedenen Progestine auf Fische wurde eine Prüfmethode etabliert, die insbesondere die Reproduktion in geschlechtsreifen Tieren adressiert [26;52-54]. Da die eingesetzten Progestine auch an androgene oder estrogene Rezeptoren binden und somit Einfluss auf die Ausprägung von sekundären Geschlechtsmerkmalen haben können, wurde in den Prüfungen auch untersucht, ob diese Substanzen im Wasser in der Lage sind, diese Merkmale beim jeweils anderen Geschlecht zu induzieren oder bei dem normal auftretenden Geschlecht zu reduzieren. Zur Etablierung eines 21-Tage-Reproduktionstests am Fisch wurden eine Methodenetablierung, ein Dosisfindungstest und ein definitiver Test mit dem Modellgestagen Levonorgestrel durchgeführt. In dem etablierten Testsystem wurden anschließend zwei weitere synthetische Progestine (Dienogest, Drospirenon) getestet. Des Weiteren wurde mit Hilfe eines Zwei-Generationen-Tests überprüft, welche die empfindlichsten Lebensstadien beim Fisch gegenüber der Modellschicht Levonorgestrel sind und ob die Ergebnisse aus dem Reproduktionstest indikativ für die Wirkungen im Zwei-Generationen-Test sind.

### 3.2.1 Zucht der Dickkopfelritzen

Für die Reproduktionstests wurden adulte, gesunde Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*, Züchter Ökotoxikologie BSP AG, Herkunft Osage Catfisheries Inc., Osage Beach, MI/USA) eingesetzt. Für den Zwei-Generationen-Test wurde frischer Laich (<24h) benötigt, zu diesem Zweck wurde eine eigene Zucht etabliert. Die Zucht wurde nach der US EPA Guideline 600/4-90/027F, Appendix A (1993) und nach KRAMER [55] durchgeführt.

### 3.2.2 21-Tage Reproduktionstoxizitätstest am Fisch

Dem Reproduktionstest am Fisch liegt ein Richtlinien-Entwurf der OECD [52;56] zugrunde, der etabliert und um einige Endpunkte ergänzt wurde. Das Testverfahren dient der Detektion von endokrin aktiven Substanzen bei geschlechtsdimorphen Fischen und befindet sich derzeit in der Validierungsphase.

Nach dem Testprinzip werden Reproduktion, Verhalten sowie die Morphologie der Fische während einer dreiwöchigen Vorlaufphase ohne die Zugabe der Testsubstanz festgehalten und mit den Beobachtungen während der dreiwöchigen Expositionsphase verglichen. Zu beobachtende Endpunkte sind hierbei die Morphologie (sekundäre Geschlechtsmerkmale), der Vitellogeningehalt sowie die histologischen Veränderungen (Histologie,

Immunhistochemie) in den Reproduktionsorganen. Zusätzlich untersucht wurde in dieser Arbeit der Reproduktionserfolg der behandelten Tiere untersucht, da dies als ein sensibler Parameter im Zusammenhang mit der Exposition gegenüber synthetischer Steroide wie den Progestinen erachtet wurde.

### 3.2.2.1 Einsetzen der Tiere

Es wurden 16 Paare von unbehandelten, adulten Fettkopfbrassen mit bereits gut ausgeprägten sekundären Geschlechtsmerkmalen in belüftete 20L-Aquarien eingesetzt, die mit Laichhöhlen ausgestattet waren (Abb. 3.1). Die Tiere waren in guter gesundheitlicher Verfassung und wiesen keine offensichtlichen Missbildungen auf. Die Fütterung während der gesamten Versuchsdauer erfolgte 2x täglich mit speziellem, östrogenfreiem Flockenfutter ad libitum (Tetra Pro, siehe Kap. 3.3, Hormongehalt im Fischfutter).



Abbildung 3.1: Weibliche und männliche Fettkopfbrasse (*Pimephales promelas*) mit Laichhöhle.

### **3.2.2.2 Testbedingungen**

#### **3.2.2.2.1 Eingesetzte Konzentrationen**

Für die definitiven Reproduktionstests wurden folgende nominale Konzentrationen eingesetzt:

|                 |                        |
|-----------------|------------------------|
| Levonorgestrel: | 2, 20 und 100 ng/L     |
| Dienogest:      | 100, 500 und 1000 ng/L |
| Drospirenon:    | 2, 20 und 200 µg/L     |

Die gewählten Konzentrationen ergaben sich zum Einen aus einer Abschätzung der umweltrelevanten Konzentrationen (<10 ng/L) sowie den Daten zur akuten Toxizität der drei Progestine am Fisch (>7 mg/L; BSP AG) und Ergebnissen aus eigenen Dosisfindungsstudien. Da es sich bei den Studien um chronische Tests handelt, wurde hier ein Sicherheitsfaktor von 100-1000 angesetzt. Die Substanz wurde jeweils in Leitungswasser oder bei Bedarf mithilfe eines Lösungsvermittlers (Triethylenglycol) gelöst und in berechneten Mengen in einem Mischgefäß mit dem Verdünnungswasser unter Rühren vereinigt. Hierbei wurde beachtet, dass die Eiablage/Paar und Tag den empfohlenen Qualitätskriterien der OECD Richtlinie (10-20 Eier/Reproduktionstag) [56] entsprach.

#### **3.2.2.2.2 Versuchsaufbau**

Alle vier Testgruppen (drei Konzentrationen, eine Leitungswasser-/Lösungsvermittlerkontrolle) wurden in vier Parallelansätzen geführt (Abb. 3.2). Zu Beginn wurde in einer 14-21-tägigen (oder bis sich eine gleichmäßige Reproduktion einstellte, d.h. etwa alle 3-4 Tage ein Gelege/Paar) Vorlaufphase ohne Substanzzugabe die Reproduktionsrate erfasst. Zeigte ein Paar über 7 Tage keine Gelege, wurde eines der Tiere ausgetauscht. Dies wurde wiederholt, bis ein regelmäßiger Reproduktionserfolg erreicht war. Die Mindestdauer des Vorlaufes mit Reproduktionserfolg betrug 21 Tage. Die Aquarien wurden nach vorne hin mit einer undurchsichtigen Folie verschlossen, um eine übermäßige Störung der Fische und damit eine mögliche Vernachlässigung des Brutgeschäftes zu vermeiden.



Abbildung 3.2: Versuchsaufbau 21-Tage Reproduktions-Test.

### **3.2.2.2.3 Messungen und Beobachtungen**

Anschließend wurden die Tiere in einer 3-wöchigen Expositionsphase mit Substanzzugabe behandelt. Während der Exposition wurden ebenfalls Zahl und Größe der Gelege sowie geschlechtsspezifische morphologische Veränderungen, Verhalten und Mortalität der Fische erfasst. Die Gelege der Paare wurden mit Hilfe eines Binokulars auf ihren Entwicklungsstand hin untersucht, nicht befruchtete und abgestorbene Eier wurden gezählt und notiert.

Zur Gehaltsanalyse wurden in der Regel jeweils am Ende der ersten, der zweiten und dritten Expositionswoche Proben der Testlösung entnommen. Die Proben wurden bis zur Gehaltsbestimmung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert, so diese nicht unmittelbar erfolgte. Die Durchflussmenge des Verdünnungswassers wurde zu Beginn der Prüfung eingestellt und überprüft. Die Zugabe der Testsubstanz erfolgte durch eine Infusionspumpe (Infors HT, Bottmingen/ Schweiz) mit aufgesteckter Kunststoffspritze (BD Plastipak, NJ/USA, 60 mL). Der Verbrauch der Stammlösung wurde alle 48 h durch Messung des Kolbenvortriebes ermittelt. Sauerstoffkonzentration, pH-Wert und Temperatur wurden einmal wöchentlich gemessen und dokumentiert. Das Verdünnungswasser wurde dem hauseigenen Leitungsnetz entnommen und in einem vorgeschalteten Tank belüftet und ggf. temperiert. Die Mengenregulierung des Verdünnungswassers erfolgte mittels einer Schlauchpumpe (Heidolph, Kelheim/D).

Der Ablauf aus den Aquarien gelangte über eine mit Aktivkohle betriebene Reinigungsanlage in das Abwassersystem. Die abiotischen Bedingungen wurden wie folgt festgelegt:

|                   |                                                             |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| Durchflussrate:   | ca. 5 L/h (dies entspricht 6 Wasserwechseln pro Tag/Becken) |
| Wassertemperatur: | 25 °C ± 1°C                                                 |
| Sauerstoffgehalt: | > 60 % des Sättigungswertes                                 |
| pH-Wert:          | 6,5 – 8,5                                                   |
| Beleuchtungszeit: | 16 Stunden Tag / 8 Stunden Nacht Rhythmus                   |
| Aquarienart:      | Glasaquarien mit Überlauf; Füllmenge ca. 20 L               |

Die Fische wurden nach Versuchsende mit einer Überdosis Ethyl-3-aminobenzoat-methansulfonat (MS 222; MP Biomedicals, OH/USA) bis zum Ableben narkotisiert und für die histologische Untersuchung präpariert.

### 3.2.2.3 Auswertung

Zur Auswertung des reproduktionstoxikologischen Effektes der Substanz wurde der relative Reproduktionserfolg pro Brutpaar (Eier/Paar, Eier/Gelege, Gelege/Zeit) vor und während der Behandlung erfasst sowie die Kontrollen mit den Behandlungsgruppen verglichen.

Die Anzahl der befruchteten Eier wurde bestimmt, indem die Eier mithilfe des Binokulars auf erste Anzeichen der Mehrzellstadiums untersucht wurden. Weiterhin werden die Fettkopfrassen auf Anzeichen der Veränderung ihrer sekundären Geschlechtsmerkmale (Nuptialtuberkel, Färbung, Fatpad) und des Verhaltens (Brutverhalten, Aggressivität) untersucht.

Um morphologische Veränderungen der Zielorgane (Reproduktionsorgane, Leber) festzustellen, wurden Gewebeschnitte von 3-5 µm Dicke mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und begutachtet (siehe Kap. 3.5 Histopathologie). Mit Hilfe eines etablierten Immunoassays ("Enzyme-linked Immunosorbent-Assay", ELISA) für Dickkopfelritzen-Vitellogenin (*Biosense Laboratories AS*, Bergen/Norwegen, siehe Kap. 3.4.) wurde bei einem Teil der Fische die Vitellogeninkonzentration nach Prüfungsende im Ganzkörper-Homogenat bestimmt. Da die Vitellogenin-Synthese ein estrogen-abhängiger Prozess ist, kann der Test Aufschluss über eine Veränderung der normalen Hormonkonzentration im Blut der Fische geben.

#### **3.2.2.4 Statistische Auswertung**

Die primären Parameter für die statistische Auswertung waren die Gesamtanzahl an Eiern über die drei Wochen der Exposition sowie die Gelegegröße (Anzahl Eier pro Gelege). Des Weiteren konnte durch die Vorlaufphase ohne Substanzzugabe jede Gruppe mit ihrer eigenen Vorlaufphase verglichen werden und so als direkte Kontrolle (Kovariable) fungieren. Um den Vergleich der Primärparameter unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Dauer der Vorlauf- und Expositionsphase zu ermöglichen, wurden die Werte der Vorlaufphase für die deskriptive Statistik auf die Dauer der Expositionsphase normalisiert.

Für die Analyse der kumulativen Anzahl an Eiern wurden generalisierte Schätzgleichungen angewendet, wobei die Linkfunktion die negative Binomialverteilung modelliert. Schätzungen zu den Unterschieden der Anzahl Eier pro Gelege wurden durch ein gemischtes Modell ("General-mixed-Model") unter Verwendung separater Varianzkomponenten für jede Behandlungsgruppe erreicht, um mit der Varianzheterogenität (große Schwankungen innerhalb der Gruppen) umzugehen. Aus diesem Grund wurden Satterthwaite-Freiheitsgrade in der Berechnung der Tests und Konfidenzintervalle eingesetzt. Die Vorlaufwerte wurden als Kovariable miteinbezogen. Es wurden keine Anpassungen für die Multiplizität vorgenommen. Alle Analysen wurden mit dem Programm SAS 9.1 durchgeführt.

### 3.2.3 Zwei-Generationen-Test am Fisch

Um die empfindlichsten Zeitfenster im Leben eines Fisches gegenüber der Exposition mit synthetischen Gestagenen zu identifizieren, wurde ein Zwei-Generationen-Test mit den Endpunkten Schlupferfolg, Überleben, Länge/Gewicht, Reproduktionserfolg sowie Schlupferfolg und Länge/Gewicht der F<sub>1</sub>-Generation durchgeführt. Für diese Studie wurden Eier von Dickkopflritzen (*Pimephales promelas*) eingesetzt und über den gesamten Lebenszyklus (vom <24h alten Ei bis zur F<sub>1</sub>) mit Levonorgestrel behandelt.

In einer ersten Dosisfindung wurde als niedrigste Konzentration 0,2 ng/L eingesetzt, die weiteren Test-Konzentrationen waren 2,0 und 20,0 ng/L. Die höchste Konzentration von 20,0 ng/L stellt einen Wert oberhalb der an Abflüssen von Kläranlagen zu erwartenden Umweltkonzentrationen dar. Eine erste Abschätzung der allgemeinen Belastung von deutschen Gewässern mit Levonorgestrel auf Grundlage von Verkaufsdaten levonorgestrelhaltiger Präparate (Angaben: BSP AG, "Global Market Research") ergab eine Belastung des Abwassers mit 2,0 ng/L und nach Verdünnung in Oberflächengewässern eine geschätzte Konzentration von 0,2 ng/L.

Diese Dosisfindung musste aufgrund von geringen Schlupfraten in allen Gruppen abgebrochen werden. Da in der Zwischenzeit weitere Erkenntnisse zum Verhalten und der Wiederfindung von Levonorgestrel in der Testlösung vorlagen, und sich zeigte, dass die Testsubstanz nur zu etwa einem Drittel wieder gefunden wird, wurden bei dem zweiten, definitiven Ansatz höhere Nominalkonzentrationen (5, 50 und 100 ng/L) eingesetzt, um eine entsprechende Verfügbarkeit der Substanz im Testsystem zu gewährleisten.

#### 3.2.3.1 Zuchtbedingungen

Um Embryonen für den Einsatz in die Testsysteme zu erhalten, wurden vor Beginn einer Studie mehrere Zuchtgruppen bestehend aus jeweils einem gut entwickelten Männchen und 2-3 unauffälligen Weibchen in 20-L Glasaquarien abgesondert. Jedes der Becken enthielt außerdem eine Bruthöhle aus Ton, an deren Wand der Laich abgelegt werden konnte. Die Tiere wurden so lange bei 25°C ± 1°C, einem pH-Wert von 6,5 - 8,5 und einem 16 / 8 h -Tag/ Nacht-Rhythmus gehältert, bis ausreichend Gelege für den Beginn einer Studie vorlagen. Anschließend wurden die Elterntiere wieder in die Gruppenhaltung integriert. Die Fütterung erfolgte 2x täglich mit speziellem, estrogenfreiem Flockenfutter ad libitum (Tetra Pro, siehe Kap. 3.3, Hormongehalt im Fischfutter). Mindestens einmal wöchentlich wurden die abiotischen Parameter (Temperatur, pH-Wert, O<sub>2</sub>-Sättigung) bestimmt und eventuelle Futterreste und Kot entfernt.

### 3.2.3.2 Einsetzen der Tiere

Pro Becken wurden zwei Plexiglaszylinder mit jeweils 60 Eiern eingesetzt. Die Eier wurden von mindestens drei Zuchtpaaren gewonnen, deren Laich gepoolt und anschließend in 10er Gruppen randomisiert in die Zylinder eingesetzt wurde. Die Eier waren beim Einbringen in die Kammern nicht älter als 24 Stunden und wurden zuvor in Frischwasser gespült. Vor dem Einsetzen wurden die Eier auf ihren embryologischen Entwicklungsstand mikroskopisch untersucht. Sterile oder erkrankte Eier wurden ausgezählt und verworfen.

Die Fütterung erfolgte dreimal täglich (am Wochenende zweimal täglich) ad libitum mit frischen Artemien-Nauplien, später zweimal täglich mit Flockenfutter (gemörsert, TetraPro). Die Becken wurden- wenn möglich (Größe der Fische)- jeden Tag außer am Wochenende gereinigt und von Kot und Futterresten befreit.

Bis zum Schlupf wurden die Eier kontinuierlich in den Zylindern in den Aquarien durch eine Apparatur auf und ab bewegt (Abb. 3.3). Sobald alle Larven geschlüpft waren, wurden die Zylinder am tiefsten Punkt fixiert. Eine Woche nach Schlupf wurden die freischwimmenden Larven gezählt, aus den Zylindern in das Becken überführt und die zwei Untergruppen damit vereinigt.

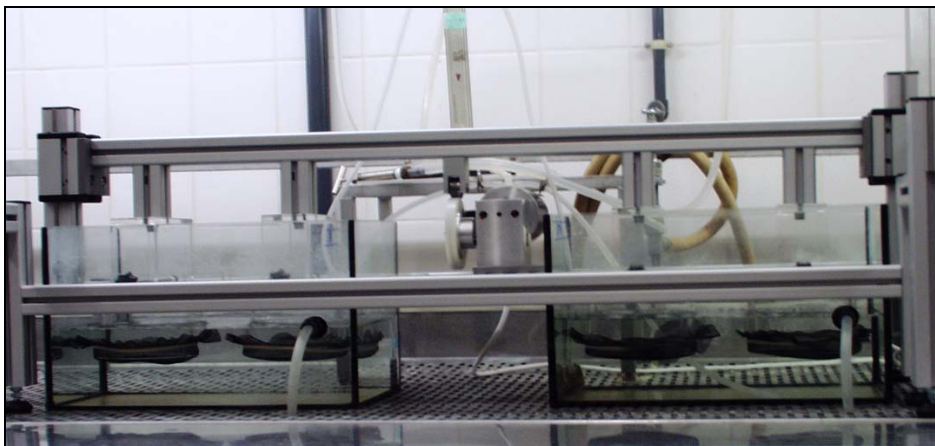


Abbildung 3.3: ELS-Apparatur mit zwei Zylindern pro Becken, die Zylinder sind mit einer Gaze verschlossen (400µm).

Am Tag 56 nach Schlupf wurden die Tiere jeder Gruppe auf zwei 20L-Becken verteilt, wo sie bis zum Erlangen der Geschlechtsreife blieben. Zeigten die Tiere dann erste Anzeichen sekundärer Geschlechtsmerkmale wie eine Färbung der Rücken- und Schwanzflosse, wurden aus den verbleibenden Tieren je Konzentration 8 Paare gebildet, um deren Reproduktionsfähigkeit zu überprüfen. Die Fische wurden weiterhin den entsprechenden



Konzentrationen der Testsubstanz ausgesetzt, um feststellen zu können, ob ihre Reproduktion beeinträchtigt ist. Aus den Gruppen, bei denen sich eine regelmäßige Reproduktion einstellte, wurden Eier für einen weiteren Embryo-Larven-Test gewonnen. Wegen der Verringerung einer paarspezifischen Prädisposition wurde die Exposition der F<sub>1</sub>-Generation erst gestartet, wenn mindesten zwei zeitgleiche Gelege vorhanden waren, um daraus 30 Eier je Zylinder randomisiert einsetzen zu können (s.o.).

### **3.2.3.3 Testbedingungen**

Die Zugabe der Testsubstanz sowie die Festlegung der abiotischen Bedingungen erfolgten analog zum Reproduktionstest (Kap. 3.2.2.2).

Als Validitätskriterien wurde eine Schlupfrate von mehr als 66% und eine Mortalität während der Aufzuchtphase unterhalb von 30% vorausgesetzt [53].

#### **3.2.3.3.1 Eingesetzte Konzentrationen**

Die Konzentration der Stammlösung wurde nach den gewünschten Testkonzentrationen und der Durchflussmenge des Verdünnungswassers (5 L/h) berechnet.

Zur Vereinfachung der Versuchsdurchführung wurden die benötigten Stammlösungen in größeren Mengen hergestellt und über den Versuchszeitraum bei Raumtemperatur gelagert. Diese Hauptstammlösungen setzten sich wie folgt zusammen:

|           |                |
|-----------|----------------|
| Gruppe 1: | Leitungswasser |
| Gruppe 2: | 0,025 mg/L LNG |
| Gruppe 3: | 0,25 mg/L LNG  |
| Gruppe 4: | 0,5 mg/L LNG   |

#### Testkonzentrationen, nominal:

|           |                              |
|-----------|------------------------------|
| Gruppe 1: | Leitungswasser               |
| Gruppe 2: | 5 ng LNG/ Liter Testlösung   |
| Gruppe 3: | 50 ng LNG/ Liter Testlösung  |
| Gruppe 4: | 100 ng LNG/ Liter Testlösung |

### 3.2.3.3.2 Versuchsaufbau

Der Versuch wurde im Durchflussverfahren mit 3 verschiedenen Testkonzentrationen und einer Leitungswasserkontrolle durchgeführt (Abb. 3.4). Bis 30 Tage nach Schlupf wurden Aquarien mit einer Füllmenge von 10L verwendet. Im Anschluss wurden die Tiere in 20L-Becken umgesetzt und als Duplikat weitergeführt. Am Tag 139 wurden je vier Paare der geschlechtsreifen Fische in 20L-Aquarien gebracht (Abb. 3.5) während die restlichen Tiere wieder in einem Becken vereint und bis zum Versuchsende weiter exponiert wurden.



Abbildung 3.4: Versuchsaufbau (Aufzuchtphase Jungfische, Tag 30) des Zwei-Generationen-Tests am Fisch.

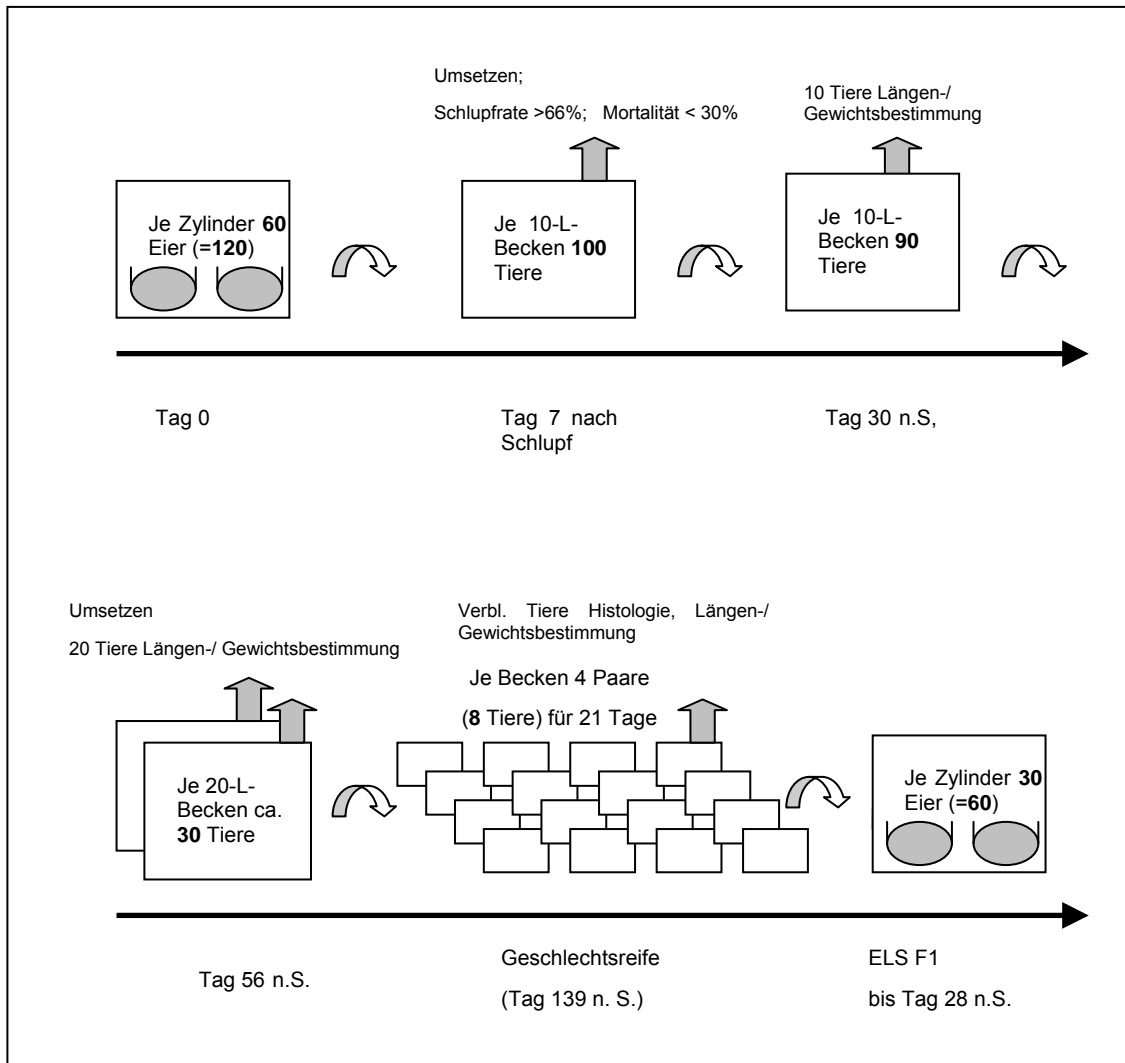


Abbildung 3.5: Schematischer Ablauf des Zwei-Generationen-Tests am Fisch; Phasen und Probenentnahmen.

### 3.2.3.3.3 Messungen und Beobachtungen

Die Temperatur, der pH-Wert und der O<sub>2</sub>-Gehalt wurden zunächst täglich und ab Tag 30 einmal wöchentlich erfasst. Außerdem wurden täglich (außer am Wochenende) Schlupf und Mortalität erfasst. Tote Embryos, Larven oder Jungfische wurden soweit möglich entfernt. Fische mit abnormen Verhaltensmustern wie Apathie, Hyperventilation oder Verlust des Gleichgewichts wurden erfasst.

Die Durchflussmenge des Verdünnungswassers wurde zu Beginn der Prüfung eingestellt und wöchentlich überprüft sowie der Verbrauch der Stammlösung durch Messung des Kolbenvortriebes ermittelt. Sauerstoffkonzentration, pH-Wert und Temperatur wurden anfangs alle zwei Tage, ab Tag 30 einmal wöchentlich gemessen und dokumentiert. Über

den gesamten Versuchszeitraum wurden Verhalten und Mortalität der Fische aufgenommen sowie später die Anzahl der befruchteten und unbefruchteten Gelege pro Weibchen und Zeit.

Während der gesamten Versuchsphase wurde ein Probenvolumen von je 500 ml pro Testgefäß (einschl. Kontrollgruppe) entnommen und bei ca. -18°C tiefgefroren. Die Probennahmezeitpunkte waren: Tag 0 (Expositionsbeginn), Tag 4 oder 5 (Schlupf), Tag 28, Tag 56, bei Erlangen der Geschlechtsreife (Tag 130) und am Expositionsende (Tag 160 nach Schlupf). Um die Stabilität der Stammlösung sowie den Substanzgehalt der Testlösungen zu überprüfen, wurden nach dem Ansetzen und am Expositionsende Proben der Stammlösung und zu drei weiteren Zeitpunkten entnommen und analysiert.

An drei Zeitpunkten wurden Fische aus jeder Gruppe in MS 222 getötet und für eine Längen- und Gewichtsmessung entnommen: Tag 30 n.S. (je 10 Fische), Tag 56 n.S. (20 Fische) und am Ende der Exposition (Tag 160, alle verbliebenen). Aus den jeweiligen Werten für Länge und Gewicht der Fische zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde ein Konditionsfaktor ("Condition factor", CF) bestimmt:

$$\text{CF} = \text{Gewicht (g)} / \text{Länge (mm)} \times 100$$

Außerdem wurden Länge und Gewicht der Jungfische der  $F_1$ -Generation am Tag 28 aufgenommen. Die adulten Tiere wurden nach Expositionsende (Tag 160) auf ihre sekundären Geschlechtsmerkmale hin untersucht und für eine histologische Geschlechtsbestimmung in Formalin fixiert (siehe Vorsektion Histologie, 3.9.1).

### 3.2.3.4 Auswertung

Die Ergebnisse des Schlupferfolges und der kumulativen Mortalität am Tag 30 wurden statistisch mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem t-Test ausgewertet. Für die Länge und das Körpergewicht nach 30, 56 und 160 Tagen wurde angenommen, dass die Längen und Gewichte einer log-Normalverteilung folgen. Daher wurde eine mehrfaktorielle ANOVA mit den Faktoren Behandlung, Zeitpunkt und der Interaktion von Zeitpunkt und Behandlung verwendet, um die behandlungsspezifischen Unterschiede im Wachstum über die Zeit festzustellen. Alle Analysen wurden mit dem Programm SAS 9.1 durchgeführt.

### 3.3 Gehaltsanalytik

Um den Gehalt und die Stabilität der Stammlösungen zu überprüfen, wurden von diesen direkt nach dem Ansetzen und am Ende der Expositionszeit Proben entnommen und analysiert. Zusätzlich wurden alle Testlösungen (Behandlungsgruppen und Kontrollen) in Woche 1, 2 und 3 der Exposition beprobt. Alle Proben wurden bis zur Analytik bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Analytik wurde bei Dr. U. Noack Laboratorien, Sarstedt, durchgeführt. Als Standards wurden die Testsubstanzen von der Bayer Schering Pharma AG zur Verfügung gestellt.

#### 3.3.1 Gehaltsanalytik Levonorgestrel

Levonorgestrel wurde mit Hilfe einer HPLC-MS/MS (2695 Alliance separation module, WATERS mit Mass selective detector, Micromass Quattro Premier™ API, WATERS) unter Verwendung externer Standards analysiert. Die Analyse wurde auf einer C-18 Säule (X-Terra RP C18,  $3,5\ \mu\text{m}$ ,  $100 \times 4,6\ \text{mm}$ , SN:01673809213666, WATERS) durchgeführt. Die Detektion erfolgte im positiven Modus nach einer Electrospray Ionisation. Eine Stammlösung mit  $100\ \text{mg/L}$  LNG gelöst in Methanol wurde mit der mobilen Phase (50% Methanol: 50% Wasser incl. 0,1% Ameisensäure) verdünnt, um 7 Konzentrationen zwischen  $1$  und  $50\ \mu\text{g/L}$  zu erhalten. Daraus ergab sich die lineare Kalibrierungsfunktion in diesem Konzentrationsbereich und ein Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) von  $>0.998$ .

Die Bestimmungsgrenze ("Limit of quantification", LOQ) wurde für LNG aufgrund der niedrigen eingesetzten Dosierungen auf  $1,5\ \text{ng/L}$  festgesetzt. Zur Methodvalidierung wurden je fünf Replikate destillierten Wassers mit  $1,5\ \text{ng/L}$  und  $15\ \text{ng/L}$  ( $10 \cdot \text{LOQ}$ ) LNG dotiert und analysiert. Die Proben wurden über vorbehandelte C18-SPE Kartuschen angereichert (Anreicherungsfaktor 1000) und mit  $7,5\ \text{ml}$  Methanol eluiert. Die mittleren Wiederfindungen betragen  $98 \pm 7\%$  (RSD 7%) für den LOQ und  $91 \pm 4\%$  (RSD 4%) für  $10 \cdot \text{LOQ}$ . Zwei Kontrollproben mit destilliertem Wasser wurden analog gemessen, um auszuschließen, dass die Substanz im verwendeten Verdünnungswasser enthalten ist. Die mittlere Wiederfindung der dotierten Proben lag zwischen 70 und 110%. Die Proben der Stammlösungen wurden mit der mobilen Phase verdünnt. Die Proben der Testlösungen aus den Aquarien wurden filtriert, um vorhandene Rückstände von Futter, Faeces etc. zu entfernen. Anschließend wurden sie analog zu den dotierten Proben aufkonzentriert und gemessen.

### 3.3.2 Test System

|                   |                                                                                                                                                                     |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HPLC-System       | HPLC: 2695 Alliance separation module, WATERS<br>Detektor: Mass selective detector, Micromass Quattro<br>Micro™ (MS/MS-detector), WATERS<br>Software: MassLynx™ 4.1 |
| Säule             | Nucleosil 100-5 C18, 5 µm, 125 x 3 mm.<br>LOT: 21303112, MACHEREY-NAGEL                                                                                             |
| Temperatur        | 20°C (Säulenofen)                                                                                                                                                   |
| Injektionsvolumen | 20 µL                                                                                                                                                               |
| Flussrate         | 0,5 mL/min                                                                                                                                                          |
| Mobile Phase      | Methanol Ammoniumformiat (0,15% v/v) 60/40 (v/v)                                                                                                                    |
| Laufzeit          | 18 min                                                                                                                                                              |

### 3.3.3 LC-MS/MS Detektion

|                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| Typ                          | Multiple reaction monitoring |
| Ionisationsmodus             | Electrospray positiv         |
| Masse (Mutter Ion)           | 313,3 Da                     |
| Masse (Tochter Ion)          | 108,95 Da                    |
| Ionisationsenergie           | 0,5 kV                       |
| Spannung                     | 30 V                         |
| Temperatur                   | 120 °C                       |
| Trägervgas (N <sub>2</sub> ) | 500 L/h (500°C)              |
| Cone Gas (N <sub>2</sub> )   | 50 L/h                       |
| Kollisionsgas (Ar)           | 0,3 mL/ min                  |
| Kollisionsenergie            | 30 eV                        |
| Aufenthaltsdauer im Ofen     | 0,5 sek                      |

### 3.3.3.1 Validierung

Für die Quantifizierung von Levonorgestrel wurde die Peakfläche auf Basis des externen Standards berechnet:

$$C_{TI} = \frac{PA_{TI} - a}{m} \times D.f.$$

|           |   |                                                                 |
|-----------|---|-----------------------------------------------------------------|
| $C_{TI}$  | = | Konzentration Levonorgestrel ( $\mu\text{g/L}$ )                |
| $PA_{TI}$ | = | Peakfläche Levonorgestrel (counts)                              |
| $a$       | = | Ordinaten-Abschnitt der linearen Regressionskurve               |
| $m$       | = | Steigung der lin. Regressionskurve [(counts)/ $\mu\text{g/L}$ ] |
| D.f.      | = | Verdünnungsfaktor                                               |

### 3.3.4 Gehaltsanalytik Dienogest

Die Analytik von Dienogest erfolgte mit Hilfe eines HPLC-MS/MS-Systems (2695 Alliance separation Module, mit MS/MS Detektor Quattro Micro<sup>TM</sup> API, WATERS) auf einer C-18 Säule über eine Elektrospray-Ionisation im positiven Modus. Eine Stammlösung mit 100 mg/L Dienogest gelöst in Methanol wurde mit 50% Methanol : 50% Ammoniak / Ameisensäure (0,0375% / 0.15%) verdünnt, um 9 Konzentrationen zu erhalten. Daraus ergab sich die quadratische Kalibrierungsfunktion in diesem Konzentrationsbereich und ein Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) von  $>0.992$ .

Die Nachweisgrenze ("Limit of detection", LOD) des analytischen Systems lag bei 0,0125  $\mu\text{g/L}$  (signal/noise-Verhältnis). Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde daher auf 0,0375  $\mu\text{g/L}$  festgelegt (3x LOD). Zur Methodvalidierung wurden je fünf Replikate destillierten Wassers mit 0,05  $\mu\text{g/L}$  und 0,5  $\mu\text{g/L}$  (10\*LOQ) Dienogest versetzt und analysiert. Zwei Kontrollproben mit destilliertem Wasser wurden analog gemessen, um auszuschließen, dass die Substanz im verwendeten Verdünnungswasser enthalten ist. Die mittlere Wiederfindung der dotierten Proben lag zwischen 84 and 93%. Die Proben der Testlösungen aus den Aquarien wurden aufgetaut und filtriert, um eventuelle Rückstände von Futter, Faeces ect. zu entfernen. Anschließend wurden die Stammlösungen analog zu den dotierten Proben 1:1000 mit Methanol verdünnt, die Proben der Testlösungen wurden direkt gemessen.

### 3.3.5 Gehaltsanalytik Drospirenon

Drospirenon wurde mit Hilfe eines LC-MS/MS-Systems (Acquity™ Ultra Performance LC, mit Acquity™ Ultra Performance LC TQ-MS/MS Detektor, WATERS) auf einer C-18 Säule über eine Elektrospray-Ionisation im positiven Modus analysiert. Eine Stammlösung mit 100 mg/L Drospirenon gelöst in Methanol wurde mit der mobilen Phase (50% 0,1% Ameisensäure in HPLC-Wasser : 50% 0,1% Ameisensäure in Methanol) verdünnt, um 7 Konzentrationen zwischen 0,5 und 100 µg/L zu erhalten. Daraus ergab sich die quadratische Kalibrierungsfunktion in diesem Konzentrationsbereich und ein Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) von  $>0,9998$ .

Die Bestimmungsgrenze wurde aufgrund der gewählten Konzentrationen auf 2 µg/L eingestellt. Zur Methodvalidierung wurden je fünf Replikate destillierten Wassers mit 2 µg/L und 20 µg/L ( $10 \cdot \text{LOQ}$ ) Drospirenon dotiert und analysiert. Die Proben wurden mit Methanol verdünnt (Verdünnungsfaktor 2). Zwei Kontrollproben mit destilliertem Wasser wurden analog gemessen, um auszuschließen, dass die Substanz im verwendeten Verdünnungswasser enthalten ist. Die mittlere Wiederfindung der dotierten Proben lag zwischen 70 and 110%. Die Proben der Testlösungen aus den Aquarien wurden filtriert, um vorhandene Rückstände von Futter und Faeces zu entfernen. Anschließend wurden sie analog zu den dotierten Proben mit Methanol verdünnt (Kontrolle, niedrige und mittlere Dosis Faktor 2, höchste Dosis Faktor 20) und gemessen.



### **3.4 Bestimmung des Hormongehaltes im Fischfutter mittels Transaktivierungstests in U-2 OS (humane Osteosarcoma-) Zellen**

Um zu überprüfen, ob kommerzielle Flockenfutter Phytohormone enthalten, die mögliche Substanzeffekte verfälschen können, wurde ein Transaktivierungstest für estrogene Agonisten und Antagonisten am ER mittels humaner Osteosarkoma-Zellen in der Abteilung CRBA Gynäkologie and Andrologie der Bayer Schering Pharma AG durchgeführt.

Folgende Futtersorten wurden untersucht:

- 1.) Pro Aqua Brut Forellenaufzuchtfutter (Milkivit Trouw Nutrition Deutschland, Burgheim/D)
- 2.) Sera Vipar Hauptfutter (Sera, Heinsberg/D)
- 3.) TetraMin Hauptfutter (Tetra GmbH, Melle/D)
- 4.) Tetra Pro Premiumfutter (Tetra GmbH, Melle/D)
- 5.) Multifit Hauptfutter (Fressnapf GmbH, Krefeld/D)

Für die Extraktion der Inhaltsstoffe wurden die fünf Futterproben á 20 g zermörsert und mit 150 mL reinem Ethanol gelöst. Die Lösungen wurden für 18 Stunden im Über-Kopf-Schüttler aufgeschüttelt, nach dem Absetzen der festen Bestandteile wurde der Überstand (100 mL) abgenommen und bei 3000 U/min und 1500 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend erneut abgenommen und durch das Abblasen mit Druckluft auf ca. 1 mL eingengt. Für den Test wurde der Extrakt 1:1000 verdünnt

#### **3.4.1 Transaktivierungstest für estrogene Agonisten und Antagonisten**

Im Transaktivierungstest werden spezielle steroidhormonrezeptorabhängige Promotorsequenzen mit einem Reporter gen in eine geeignete Zelle transfiziert, wo mit Hilfe des Transaktivator gens ein Transkriptionsfaktor exprimiert wird, der durch die Induktion mit dem entsprechenden Hormon zur konzentrationsabhängigen Expression des gewünschten Gens führt. Das Reporter gen (Luciferase) macht diese Expression sichtbar.

Für den Test auf Agonismus oder Antagonismus am ER $\alpha$  und ER $\beta$  wurden jeweils Dreifachbestimmungen vorgenommen, zur Ermittlung der Wirkstärke des Agonismus wurden 6 Konzentrationen, für den Antagonismus 3 Konzentrationen eingesetzt.

Zellkultur: Die U-2 OS Zellen wurden in *Dulbecco's* Medium (D-MEM) ohne Phenolrot (Gibco Invitrogen, Karlsruhe/D) mit 5% fetalem Kälberserum (FKS, Biochrom AG, Berlin/D) und 100 Einheiten/mL Penicillin/ 100 $\mu$ g/mL Streptomycin (PAA, Pasching/Österreich), 4nM l-Glutamin (Gibco BRL; PSG/ Invitrogen, Karlsruhe/D) bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Zellen, die mindestens 24 h in D-MEM mit 5% Aktivkohle-behandeltem FKS (CCS) + PSG gehalten wurden, wurden mit PBS- *Dulbecco's* (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe/D) gewaschen und trypsiniert (Trypsin/EDTA 0,05/0,20%; PAA, Pasching/Österreich). Die Suspendierung der Zellen erfolgte in 10 mL D-MEM + 5% CCS + PSG.

Bestimmung der Lebendzellzahl:                            100  $\mu$ L Zellsuspension  
                                                                                  + 50  $\mu$ L Trypanblaulsg. (0,5%)  
                                                                                  + 350  $\mu$ L PBS

Es wurden 8 Großquadrate einer *Schilling Kreuznetz*-Kammer (Tiefe 0,1mm/0,0025mm<sup>2</sup>) ausgezählt.

Berechnung:  $\frac{\text{Gesamtzahl der lebenden Zellen}}{8} \times 0,5 \times 10^5 = \text{Lebendzellzahl / mL Zellsuspension}$

Nach einer Verdünnung von  $8 \times 10^6$  Zellen auf 80 mL mit D-MEM + 5% fetalem Kälberserum (CSS + PSG) wurden 100  $\mu$ L Zellsuspension ( $1 \times 10^4$  Zellen) pro Well (96-Well-Platten, BD Biosciences, Heidelberg/D) ausgesät. Sechs Stunden nach Aussaat erfolgte die Transfektion.

Transfektion mittels *FuGENE 6*:

Die Plasmid-DNA (NucleoBond Maxi Kit, CLONTECH, Frankreich) und das *FuGENE 6*-Reagenz (Boehringer, Mannheim/D) wurden zunächst separat in einem geeigneten Volumen D-MEM verdünnt und inkubiert, bevor die Lösungen vereinigt und wiederum inkubiert wurden.

Ansätze für eine 96-Well-Platte in 50 mL - *BlueMax*-Falcon-Röhrchen:

**A** pSG5-ER $\alpha$ / $\beta$ FL (Heg0/ER/ $\beta$ 0) (Estrogenrezeptor-Expressionsplasmid): 125 ng (1,25  $\mu$ L)

p(ERE)<sub>2</sub>-luc<sup>+</sup> (Luciferase-Reporterplasmid) : 6,25  $\mu$ g (6,25  $\mu$ L)

---

in 14 mL - Polypropylenröhrchen (Falcon):

**B** D-MEM o. Serum: 606,25  $\mu$ l

FuGENE 6: 18,75  $\mu$ l

Die Lösungen A und B wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde Lösung B tropfenweise zu Lösung A gegeben und gemeinsam für 15 Minuten bei RT inkubiert.

Das Transfektionsgemisch wurde mit 5,575 mL D-MEM + 5% CSS + PSG verdünnt. 100  $\mu$ L davon wurden pro Well auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 7,5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert.

#### **3.4.1.1 Hormonbehandlung**

Für die Dosis-Wirkungskurven wurden Verdünnungsreihen für die Referenz- und Testsubstanz mit DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA) auf 96-Well-Platten erstellt. Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass die Endkonzentration auf der Testplatte für Agonismus im Bereich von 10<sup>-8</sup> M – 10<sup>-13</sup> M und für Antagonismus im Bereich von 10<sup>-6</sup> M und 10<sup>-7</sup> M lagen. Alle verwendeten Test- und Referenzsubstanzen wurden von der Bayer Schering Pharma AG zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.4: Pipettierschema mit den mitgeführten Verdünnungen von Test- und Referenzsubstanzen. E<sub>2</sub>= Estradiol, TS1/2= Testsubstanzen, ICI= SERD (Selektiver Estrogen-Rezeptor Destabilisator; ER Antagonist)

|   | E <sub>2</sub>      |   |   | TS 1                |   |   | TS 2                |   |   | ICI                 |    |    |                                               |
|---|---------------------|---|---|---------------------|---|---|---------------------|---|---|---------------------|----|----|-----------------------------------------------|
|   | 1                   | 2 | 3 | 4                   | 5 | 6 | 7                   | 8 | 9 | 10                  | 11 | 12 |                                               |
| A | 10 <sup>-5</sup> M  |   |   | 10 <sup>-4</sup> M  |   |   | 10 <sup>-4</sup> M  |   |   | 10 <sup>-4</sup> M  |    |    | 90 µL D-MEM<br>+10 µL Hormonlsg.              |
| B | 10 <sup>-6</sup> M  |   |   | 10 <sup>-5</sup> M  |   |   | 10 <sup>-5</sup> M  |   |   | 10 <sup>-5</sup> M  |    |    | 180 µL D-MEM<br>+20 µL Hormonlsg              |
| C | 10 <sup>-7</sup> M  |   |   | 10 <sup>-6</sup> M  |   |   | 10 <sup>-6</sup> M  |   |   | 10 <sup>-6</sup> M  |    |    | 180 µL D-MEM + 1%<br>DMSO<br>+20 µL Hormonlsg |
| D | 10 <sup>-8</sup> M  |   |   | 10 <sup>-7</sup> M  |   |   | 10 <sup>-7</sup> M  |   |   | 10 <sup>-7</sup> M  |    |    | 180 µL D-MEM + 1%<br>DMSO<br>+20 µL Hormonlsg |
| E | 10 <sup>-9</sup> M  |   |   | 10 <sup>-8</sup> M  |   |   | 10 <sup>-8</sup> M  |   |   | 10 <sup>-8</sup> M  |    |    | 180 µL D-MEM + 1%<br>DMSO<br>+20 µL Hormonlsg |
| F | 10 <sup>-10</sup> M |   |   | 10 <sup>-9</sup> M  |   |   | 10 <sup>-9</sup> M  |   |   | 10 <sup>-9</sup> M  |    |    | 180 µL D-MEM + 1%<br>DMSO<br>+20 µL Hormonlsg |
| G | 10 <sup>-11</sup> M |   |   | 10 <sup>-10</sup> M |   |   | 10 <sup>-10</sup> M |   |   | 10 <sup>-10</sup> M |    |    | 180 µL D-MEM + 1%<br>DMSO<br>+20 µL Hormonlsg |
| H | 10 <sup>-12</sup> M |   |   | 10 <sup>-11</sup> M |   |   | 10 <sup>-11</sup> M |   |   | 10 <sup>-11</sup> M |    |    | 180 µL D-MEM + 1%<br>DMSO<br>+20 µL Hormonlsg |

Zum Test auf Antagonismus wurden die Zellen (B-C/4-12) zusätzlich mit Estradiol (E<sub>2</sub>) behandelt.

### 3.4.1.2 Lyse der Zellen

Nach dem Absaugen des Mediums wurden jeweils 30 µL Lysis Reagent (Promega, WI/USA) auf die Zellen gegeben und für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur unter starkem Schütteln (600rpm) inkubiert.

Anschließend wurden die Lysate mit je 30 µL Luciferase Substrat A und B (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg/D) versetzt. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte 30 Sekunden nach Zugabe von Substrat B im Luminometer (Dynatech, ML 3000, Rückersdorf/D).

### 3.4.1.3 Auswertung

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels der Luminometer-Software *BioLinx* (ML 300, DynaTech/D), die Darstellung der Ergebnisse als Dosis-Wirkungskurven mit Mittelwerten und Standardabweichung mittels *Sigma Plot* 8.0. Die Berechnung der  $EC_{50}$  bzw. der  $IC_{50}$  für den Antagonismus erfolgte über die graphische Auswertung der  $C_0$  (DMSO, minimale Bindung) und  $C_1$  (ICI, maximale Bindung), woran 50% der maximalen Bindung abgelesen wurden.

## 3.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Bestimmung von Vitellogenin, dem Dotterprotein aus dem Ganzkörper-Homogenat der behandelten Dickkopfelritzen wurde ein ELISA-Kit (Fathead minnow Vitellogenin ELISA Kit #V01018401-096, *Biosense Laboratorien AS*, Bergen/Norwegen) nach der mitgelieferten Anleitung verwendet.

Der ELISA ist ein auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion basierendes Verfahren, um Proteine nachzuweisen. Ist in der Probe das gesuchte Protein vorhanden, fangen es die auf ein Trägermedium aufgebrachten Antikörper heraus. Dabei wird eine von Enzymen gesteuerte Reaktion ausgelöst, die zu einem sichtbaren Farbumschlag führt. Die Intensität des Farbumschlages kann als Funktion der Antigenkonzentration angesehen werden, so dass der Nachweis quantitativ ist.

Zur Homogenisierung wurde 1 molarer Kaliumphosphatpuffer angesetzt (34,8 g Di-Kaliumhydrogenphosphat auf 200 mL destilliertes Wasser) und im Verhältnis 1:1 (Nassgewicht : Puffer) zu den Fischen gegeben. Nach der Homogenisierung mit einem Handhomogenisierer (Polytron PT 1200, Kinematica AG, Luzern/Schweiz) wurden die Proben bei 3000 x g bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D) und der Überstand bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

Der Überstand wurde für die Analyse aufgetaut und mit dem Verdünnungspuffer aus dem Kit (PBS + 1% BSA) verdünnt. Hierbei wurden die Proben der männlichen Fische 1:20 und 1:200 und die der weiblichen Fische 1:200 und 1:2000 verdünnt. Auf der Platte wurde eine Kontrolle ("Non-specific binding", NSB) mitgeführt, die nur Puffer enthielt, um unspezifische Bindungen zu berücksichtigen (Tab. 3.5).

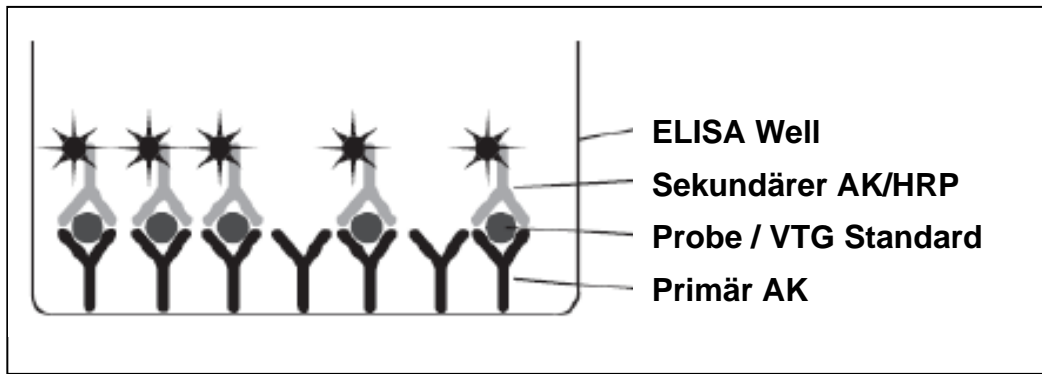


Abbildung 3.6: Prinzip des Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, HRP= Horse reddish peroxidase, VTG= Vitellogenin, AK= Antikörper. Nach: Biosense, Norwegen.

### 3.5.1 Eingesetzte Tiere

Für die Bestimmung des Vitellogenin-Spiegels der mit Levonorgestrel behandelten Fische wurden Tiere der Kontrolle und höchsten Dosisgruppe vom Tag 145 und Expositionsende der ersten Dosisfindungsstudie des Zwei-Generationen-Tests (Kontrolle und 20 ng/L) eingesetzt. Diese Proben wurden jeweils nur 1:200 verdünnt, da nicht bekannt ist, um welches Geschlecht es sich handelt. Für den Nachweis der Effekte von Dienogest wurde die Hälfte der am Expositionsende des 21-Tage Reproduktionstests getöteten Tiere der Kontrolle und der höchsten Dosisgruppe (1000 ng/L) verwendet. Die Wirkungen von Drospirenon auf den Vitellogenin-Gehalt der Fische wurde nicht untersucht.

Tabelle 3.5: Plattenbelegung ELISA. Gelb: Nicht-spezifische Bindung; Grün: Standard-Reihe; Blau: Reproduktionstest DNG; Grau: Zwei-Generationen-Test mit LNG.

|   | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8         | 9        | 10        | 11       | 12        |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| A | NSB       | S1        | S2        | S3        | S4        | S5        | S6        | S7        | S8       | S9        | S10      | S11       |
| B | NSB       | S1        | S2        | S3        | S4        | S5        | S6        | S7        | S8       | S9        | S10      | S11       |
| C | 1aM 1:20  | 1aM 1:200 | 1bM 1:20  | 1bM 1:200 | 1aF 1:200 | 1aF1:2000 | 1bF 1:200 | 1bF1:2000 | 4aM 1:20 | 4aM 1:200 | 4bM 1:20 | 4bM 1:200 |
| D | 1aM 1:20  | 1aM 1:200 | 1bM 1:20  | 1bM 1:200 | 1aF 1:200 | 1aF1:2000 | 1bF 1:200 | 1bF1:2000 | 4aM 1:20 | 4aM 1:200 | 4bM 1:20 | 4bM 1:200 |
| E | 4aF 1:200 | 4aF1:2000 | 4bF 1:200 | 4bF1:2000 | Gr.1 145  | Gr.1 145  | Gr.1 145  | Gr.1 145  | Gr.4 145 | Gr.4 145  | Gr.4 145 | Gr.4 145  |
| F | 4aF 1:200 | 4aF1:2000 | 4bF 1:200 | 4bF1:2000 | Gr.1 145  | Gr.1 145  | Gr.1 145  | Gr.1 145  | Gr.4 145 | Gr.4 145  | Gr.4 145 | Gr.4 145  |
| G | Gr.1 Ende | Gr.1 Ende | Gr.1 Ende | Gr.1 Ende | Gr.4 Ende | Gr.4 Ende | Gr.4 Ende | Gr.4 Ende | NSB      | NSB       | NSB      | NSB       |
| H | Gr.1 Ende | Gr.1 Ende | Gr.1 Ende | Gr.1 Ende | Gr.4 Ende | Gr.4 Ende | Gr.4 Ende | Gr.4 Ende | NSB      | NSB       | NSB      | NSB       |

### **3.5.2 Auswertung**

Die Auswertung erfolgte über eine Eichkurve, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des Vitellogenin-Standards (0,24-250,0 ng/L) hergestellt wurde. Der Farbumschlag des oxidierten Substrates ist dann der Menge des Vitellogenins umgekehrt proportional. Hierbei wurde die im SpectraMax Plus (Molecular Devices, CA/USA) gemessene Absorption bei 450 nm um den Betrag der nichtspezifischen Bindung (NSB) korrigiert.

Die Werte der Dosisfindungsstudie des Zwei-Generationen-Tests (Kontrolle und 20 ng/L) wurden mit Hilfe einer mehrfaktoriellen ANOVA auf signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlung untersucht. Hierbei wurden die Faktoren Behandlung, Zeitpunkt und die Interaktion zwischen Gruppe und Zeitpunkt mit den logarithmierten Vitellogenin-Konzentrationen untersucht. Auf eine statistische Auswertung der Studie mit Dienogest wurde aufgrund des geringen Probenumfangs verzichtet.

## **3.6 Histopathologie**

Die Gonaden von je zwei männlichen und weiblichen Fischen pro Gruppe (21-Tage Reproduktionstest) oder aller Fische jeder Gruppe (Zwei-Generationen-Test) wurden histopathologisch untersucht. Die Fische wurden am Versuchsende mit einer Überdosis MS-222 (MP Biomedicals, OH/USA) getötet und für histologische Gewebeschnitte in Formalin fixiert. Die Ganzkörper-Querschnitte von wurden mit Haematoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Zeiss Axioskop mit Software Axioversion, Jena/D) untersucht, um den reproduktiven Zustand (21-Tage Reproduktionstest) oder das Geschlecht (Zwei-Generationen-Test) zu bestimmen (das Staging erfolgte in Anlehnung an LEINO, 2005 [57]).

### **3.6.1 Vorsektion Histopathologie**

Die Fische wurde äußerlich beurteilt, eventuelle Veränderungen notiert. Um eine bessere Fixierung zu erreichen, wurden die Fische über 5 cm Körperlänge entlang der Bauchmittellinie von der Analflosse bis zum ersten Kiemenblatt eröffnet. Anschließend wurde jeder Fisch einzeln in 100 mL Formalin (10%; Sigma Aldrich, MO/USA) in braunen Glasflaschen für mindestens 24 h fixiert.

### 3.6.2 Gonadenaufarbeitung der Fische

Nach abgeschlossener Fixierung wurde kranial vor der Rückenflosse ein Querschnitt durch den Körper angefertigt und je nach Größe des Fisches eine ca. 5-10 mm dicke Scheibe entnommen. Diese wurden im Tissue-Tek VIP (Miles Scientific, IL/USA) schrittweise in Ethanol und Xylen entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet.

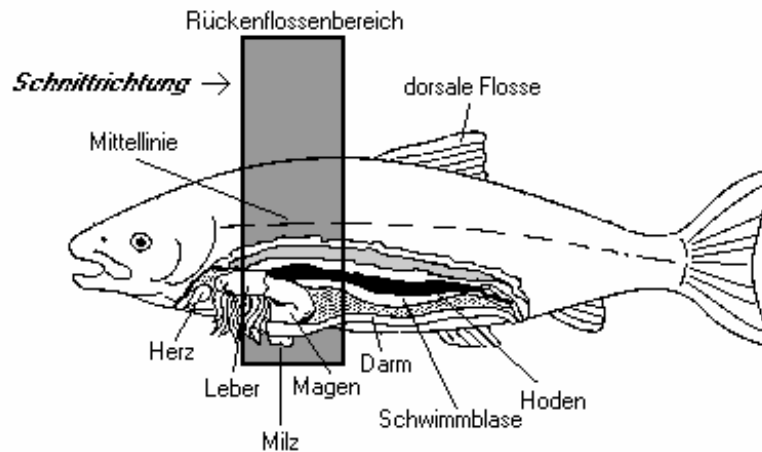


Abbildung 3.7: Sektionsschema

### 3.6.3 Schneiden /Färben

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle in 200 µm-Stufen bis zum Erreichen der Gonaden. Anschließend wurde mit 100 µm-Stufen fortgefahren, bis beide Seiten der Gonaden erkennbar waren. Die Schnittdicke betrug ca. 3-5 µm. Alle Schnitte wurden routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

## 3.7 Histomorphometrie

Zusätzlich zur Histopathologie wurden die Ovarien und Hoden der Tiere aus den Reproduktionstests auch histomorphometrisch untersucht (Software IQ Easy Measure 1.4.1) ähnlich wie bei VAN DER VEN ET AL. (2003) [58] beschrieben. Von zwei Weibchen jeder Gruppe wurden auf je zwei Schnitten pro Tier alle Oocyten gezählt und einer der Kategorien primäre Oocyten, prävitellogene Oocyten, vitellogene Oocyten oder atretische Oocyten zugeordnet.



Bei den männlichen Fischen fand die Begutachtung der Hoden auf ebenfalls zwei Schnitten pro Tier und zwei Tieren pro Gruppe statt, indem die Spermazocysten auf drei Gesichtsfeldern bei 40-facher Vergrößerung gezählt und den Kategorien Spermatogonien, Spermatozyten oder reifen Spermatozoen zugeordnet wurden.

Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Schnitte wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

### **3.8 Immunhistochemie**

Um die Mechanismen einer durch Progestine gestörten Reproduktion beim Fisch aufzuklären, sollten Veränderungen in den Geweben mittels immunhistochemischer Techniken lokalisiert werden. Der Vorteil dieser Methode ist die genaue Identifizierung und Lokalisation der antigenexprimierenden Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass nur die Zellen identifiziert werden, die die gesuchte Struktur (Protein) exprimieren und so keine Aussage über die genaue Konzentration in der Zelle gemacht werden kann, kann keine quantitative Auswertung erfolgen.

Der zentrale Parameter bei der Oocytenreifung ist die Vitellogenese (siehe Kap. 1.3.3.1). Vitellogenin ist das Vorläuferprotein der Eidotterproteine Phosvitin und Lipovitellin, es wird unter dem Einfluss von Estradiol in der Leber synthetisiert, ins Blut abgegeben, zu den Follikeln transportiert und dort gespalten. Natürlicherweise sind nur geschlechtsreife Weibchen in der Lage, Vitellogenin zu produzieren. Da aber die Vitellogenin-Produktion auch beim unreifen Weibchen und beim Männchen durch Estrogene induziert werden kann [59], kann der (semiquantitative) Nachweis einen Hinweis auf eine Veränderung in der endokrinen Steuerung geben.

Es konnten bereits Ort und Intensität der Vitellogenin-Synthese in der Leber von Fischen mittels einer immunhistochemischen Färbung sichtbar gemacht werden [60-62].

In dieser Arbeit sollte der Nachweis von Zielantigenen bei der Dickkopfelnritze mit verschiedenen monoklonalen Maus-Anti-Fisch-Antikörpern (Biosense Laboratories AS, Bergen/Norwegen) etabliert werden. Zunächst wurden mit Hilfe eines Antikörper gegen das Cytochrom P450 1A (CYP1A) der Regenbogenforelle die besten Bedingungen für einen Nachweis bei der Dickkopfelnritze (Vorbehandlung, Demaskierung, Inkubationszeiten) ausgetestet. CYP1A kann durch verschiedene Schadstoffe (PCB, PAH, Dioxine) induziert werden und dient daher als Biomarker für eine Exposition gegenüber diesen Substanzen [63]. Anschließend wurden zwei Antikörper gegen das Dotterprotein Vitellogenin verglichen; ein monoklonaler Maus-Anti-Karpfen-Vitellogenin Antikörper und ein monoklonaler Antikörper gegen das Vitellogenin von Zebrafischen. Beide Antikörper müssten geeignet

sein, da es sich bei den Dickkopfelnritzen und Zebrafischen um karpfenartige Fische handelt. Der Antikörper gegen das Zebrafisch-Vitellogenin ist im Gegensatz zum Anti-Karpfen-Vitellogenin-Antikörper schon in immunhistochemischen Nachweisverfahren erprobt worden.

### 3.8.1 Eingesetzte Tiere

Für die Etablierung der verschiedenen Nachweise wurden Schnitte von Kontroll-Dickkopfelnritzen aus einer Organbank der Bayer Schering Pharma AG entnommen. Für die Untersuchung der Effekte von Levonorgestrel auf den Vitellogenin-Gehalt wurden Fische aus einem 21-Tage Reproduktionstest (Dosisfindung) mit 0,2, 2,0 und 20,0 ng/L Levonorgestrel (nominal) verwendet. Es wurden jeweils die Schnitte von Männchen und Weibchen ausgewählt, auf denen die Leber und die Gonaden gut darzustellen waren.

### 3.8.2 Antikörper

#### 3.8.2.1 Monoklonaler Maus-Anti-Fisch CYP1A-Antikörper

Für die Etablierung der immunhistochemischen Nachweise am Fisch wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen das Peptid 277-294 des Cytochroms P450 1A von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) eingesetzt (#C10-7 Biosense Laboratorien, Bergen, Norwegen). Laut Hersteller ist der Antikörper für den Einsatz in der Immunhistochemie geeignet. Der Antikörper des Isotyps IgG<sub>3</sub>-kappa ist in 0,1 M Naphosphat, 0,15 M NaCl, 1% BSA, 0,1% Na-azid, pH 7,4 gelöst.

Der Antikörper ist ein Peptid, das mit der Aminosäuren-Sequenz 277-294 des Regenbogenforellen-CYP1A korrespondiert und an ein Trägerprotein (Keyhole limpet hemocyanin, KLH) gekoppelt ist. Vom Hersteller ist eine Kreuzreaktivität mit CYP1A aus Leberproben von Karpfen (*Cyprinus carpio*), Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Lachs (*Salmo salar*), Dorsch (*Gadus morhua*), Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) Rotzunge (*Microstomus kitt*) und Hechtling (*Clarias anguillaris*) angegeben. Die Dickkopfelnritze gehört zur Familie der Karpfenartigen (*Cyprinidae*).

Die optimale Verdünnung des Antikörpers wurde austitriert (1:20, 1:40 und 1:80) und verschiedene Vorbehandlungen getestet (ohne Vorbehandlung, mit Citrat-Puffer oder Trypsin im Dampfgerar).

### 3.8.2.2 Monoklonaler Maus-Anti-Karpfen Vitellogenin- Antikörper

Für den Nachweis von Vitellogenin in den Zielgeweben auf Ganzkörperschnitten der Dickkopfritzen wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Vitellogenin vom Karpfen (*Cyprinus carpio*) eingesetzt (#ND-2D3 Biosense Laboratorien, Bergen, Norwegen). Der Antikörper des Isotyps IgG<sub>1</sub>-kappa ist in 0,1 M Na-phosphat, 0,15 M NaCl, 1% BSA, 0,1% Na-azid, pH 7.4 gelöst. Das Vitellogenin wurde aus Plasma von mit 17β-Estradiol behandelten Streifenbarschen (*Morone saxatilis*), Katzenwelsen (*Ictalurus nebulosus*) und Karpfen gewonnen. Der Antikörper bindet mit hoher Affinität an Vitellogenin von Karpfen, Dickkopfritze (*Pimephales promelas*) und Zebrafisch (*Danio rerio*). Außerdem ist vom Hersteller eine Kreuzreaktivität mit Vitellogenin von Goldfisch (*Carassius auratus*), Meeräsche (*Mugil sp.*), Meerbrasse (*Lagodon rhomboides*) und Sauger (*Catostomidae sp.*) angegeben.

Die Anwendung des Antikörpers ist laut Hersteller nur für ELISA und Western Blot erprobt. Die optimale Verdünnung des Antikörpers für den immunhistochemischen Nachweis von Vitellogenin wurde in mehreren Schritten austitriert (1:50, 1:100 und 1:500) und mit verschiedenen Vorbehandlungen getestet (ohne, Citrat-Puffer, EDTA-Puffer oder "Fast Enzyme" im Schnellkochtopf).

### 3.8.2.3 Monoklonaler Maus-Anti-Zebrafisch-Vitellogenin-Antikörper

Als weiterer Antikörper für den Nachweis von Vitellogenin in den Ganzkörperschnitten der Dickkopfritzen wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Vitellogenin von Zebrafischen (*Danio rerio*) eingesetzt (#JE-10D4 Biosense Laboratorien, Bergen, Norwegen). Dieser Antikörper ist bereits für den Einsatz in der Immunhistochemie als geeignet beschrieben. Der Antikörper des Isotyps IgG<sub>1</sub>-kappa ist in 0,1 M Na-phosphat, 0,15 M NaCl, 1% BSA, 0,1% Na-azid, pH 7.4 gelöst. Das Vitellogenin wurde aus Plasma von mit 17β-Estradiol behandelten Zebrafischen (*Danio rerio*) gewonnen. Der Antikörper bindet mit hoher Affinität an Vitellogenin aus Ganzkörperhomogenaten von Zebrafischen. Außerdem ist vom Hersteller eine Kreuzreaktivität mit Vitellogenin von Karpfen (*Cyprinus carpio*), Dickkopfritze und Plötze (*Rutilus rutilus*) angegeben.

Die Anwendung des Antikörpers ist laut Hersteller für ELISA, Western Blot und Immunhistochemie erprobt. Die optimale Verdünnung des Antikörpers für den immunhistochemischen Nachweis von Vitellogenin wurde austitriert (1:50, 1:100 und 1:500) und mit verschiedenen Vorbehandlungen getestet (ohne, Citrat-Puffer, EDTA-Puffer oder "Fast Enzyme" im Schnellkochtopf).

### **3.8.3 Technik**

Die Organe wurden in neutral gepuffertem Formalin fixiert. Die optimale Fixierungszeit für die Immunhistochemie beträgt 16 bis 24 Stunden, je länger die Fixationszeit, desto schlechter die Immunreaktivität, da sich Methylenbrücken bilden und die Antigenstrukturen maskieren können [64]. Anschließend wurden die Schnitte schrittweise entwässert (Tissue-Tek VIP, Miles Scientific, IL/USA). Zur besseren Anhaftung der Schnitte wurden für die Immunhistochemie geeignete beschichtete Objektträger verwendet (Super Frost® Plus, Microm, Walldorf/D).

#### **3.8.3.1 Gewebevorbehandlung**

Formalinfixierung kann zur Maskierung (aldehydische Quervernetzung antigener Determinanten) bei Antigenen führen. Prinzipiell gilt für die Immunhistochemie, dass die Formalinfixierung zu Qualitätsverschlechterung der Antigenstruktur führt. Um die Antigenstruktur zu demaskieren, wurde ein Antigen-Retrieval mittels einer Hitzebehandlung (Dampfgarer/ Schnellkochtopf) durchgeführt. Die Morphologie einzelner Gewebe wurde dabei aber teilweise zerstört, so dass auf eine enzymatische Demaskierung mittels "Fast Enzyme" zurückgegriffen wurde. Die Notwendigkeit zur enzymatischen oder thermischen Vorbehandlung hängt von dem Antigen, der Art und Dauer der Fixierung, der jeweiligen untersuchten Spezies, sowie dem verwendeten Antikörper ab. Für die hier beschriebenen Nachweise wurden Ansätze ohne Vorbehandlung und mit enzymatischer oder thermischer Vorbehandlung im Schnellkochtopf miteinander verglichen und bewertet.

#### **3.8.3.2 Gebrauchslösungen**

- Neutral gepuffertes Formalin (10%; Sigma Aldrich, MO/USA)

- Trispufferlösung:

TBS pH 7.6, 0.05M (gebrauchsfertiges Konzentrat), (ProTaqstura, Luckenwalde/D))

- Lösungen für die Reduzierung von Hintergrundfärbungen:

- 3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zum Blocken der endogenen Peroxidase in VE-Wasser (30% Wasserstoff Merck, Darmstadt/D)

Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch angesetzt.

- Proteinblocking-Seren:

- Ziegen-Serum (ab7481, Abcam, Cambridge/UK)
- Esel-Serum (ab7475, Abcam, Cambridge/UK)
- Proteinblock "Serumfree" (X0909, Dako Deutschland GmbH, Hamburg/D)
- Avidin-Biotin-Block (00-4303, Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D)
- Ultra V-Block (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA/USA)

(Verwendung laut Datenblatt der Hersteller)

- Gebrauchslösung des Streptavidin-Peroxidase- (Label) Konzentrats (HRP):

Das HRP-Label-Konzentrat (HK320-UK, BioGenex, Hamburg/D) wird mit entsprechender Label-Verdünnungslösung in der mitgelieferten Tropfflasche 1:20 verdünnt.

- Chromogenlösung HRP- Substrat:

Diaminobenzidin (DAB) - Chromogen-Lösung im DAB-Substratkit (DCS, Hamburg/D))

- Negativkontrollserum:

Non-Immunsereum "Super Sensitive Mouse" (bei Anwendung von Antikörpern aus der Maus), (HK119-7M, BioGenex, Hamburg/D)

### 3.8.3.3 Durchführung der proteolytischen Enzymbehandlung

Proteolytische Enzymbehandlungslösung (Enzymatische Vorbehandlung):

"Fast Enzyme" (Zytomed Systems, Berlin/D) zeigte nach der Titration die besten Ergebnisse.

"Fast Enzyme"

1. Gewebeschnitte mit "Fast Enzyme"-Gebrauchslösung bedecken
2. Inkubieren der Schnitte in feuchter Kammer bei RT 5 min
3. 3x spülen in TBS ≤ 5 min

#### **3.8.3.4 Wärmeverbehandlung**

- Wärmeinduzierte Antigenmaskierungslösungen (Heat Induced Epitope Retrieval Solutions, HIER-Solutions):

Citratpuffer pH 6.0 (DCS, Hamburg/D)

EDTA-Puffer pH 8.0 (Zytomed Systems, Berlin/D)

#### Schnellkochtopf

1. Die entparaffinierten und in VE-Wasser gespülten Schnitte wurden in die zum Schnellkochtopf gehörende, mit "HIER-Solution" gefüllte Kunststoffküvette gebracht und vollständig mit "HIER-Solution" bedeckt.
2. Der Schnellkochtopf wurde mit 750 mL VE-Wasser gefüllt. Anschließend wurden die Kunststoffküvetten in das im Schnellkochtopf gestellte Rack gehängt.
3. Nach Schließen des Überdruckventils wurde der Zyklus für 20 min gestartet
4. Nach Ablauf des Zyklus wurde die Kunststoffküvette entnommen und bei Raumtemperatur (15 – 35 min) abkühlen gelassen.
5. Anschließend wurde dreimal in TBS für 4 - 6 min gespült.

#### **3.8.3.5 Verdünnung der primären Antikörper**

Die gelösten Antikörper wurden mit geeigneten Antikörperverdünnungslösungen (laut Datenblatt des Herstellers) verdünnt und die Verdünnungen wurden vor Gebrauch angesetzt.

Die Richtwerte zur Austestung der Verdünnung von Antikörpern wurden dem Beipackzettel der Hersteller entnommen. Die Austestung erfolgte im Titrationsverfahren. Dabei wurde die höchste Verdünnungsstufe und die Vorbehandlung bestimmt, die eine optimal spezifische Färbung bei geringstem Hintergrund bewirkt.

### **3.8.3.6 Sekundärantikörper (Brückenantikörper)**

Als Brückenantikörper wurden spezifische Sekundärantikörper verwendet. Sie wurden vor Gebrauch entsprechend der Herstellerangaben verdünnt. Das HRP-Label-Konzentrat (HK320-UK, BioGenex, Hamburg/D) wird mit entsprechender Label-Verdünnungslösung in der mitgelieferten Tropfflasche 1:20 verdünnt.

Konzentrate des BSA-Super-Sensitiv Nachweissystems:

Im Kit (BioGenex, Hamburg/D) enthalten sind Link Konzentrat und Streptavidin Peroxidase/ Alkalische Phosphatase-Konzentrat. Der Maus-Link (HK325-UM, BioGenex, Hamburg/D) wurde 1:20 mit "Link-Diluent" (H156-5KE, BioGenex, Hamburg/D) verdünnt.

### **3.8.3.7 Positive und negative Gewebekontrollen**

Zur Überprüfung der Arbeitstechnik und der Reagenzien, vor allem des primären Antikörpers, wurden zur Bestätigung der immunhistochemischen Färberesultate Kontrollen durchgeführt.

#### **1.) Positive Kontrolle / Überprüfung des Primärantikörpers**

A. Es wurde ein Gewebeschnitt mitgeführt, der das jeweils gesuchte Antigen sicher exprimiert. Unspezifische Hintergrundreaktionen sollten nicht auftreten.

#### **2.) Negative Kontrolle / Überprüfung der Reagenzien bzw. der Arbeitstechnik**

A. Es wurde immer ein Gewebeschnitt mitgeführt, der ohne Primärantikörper inkubiert wurde. Er wird mit dem jeweiligen Nicht-Immunsereum behandelt, oder ein anderer Antikörper wird anstelle des Primärantikörpers mitgeführt, dessen Antigen jedoch in dem zu untersuchenden Gewebe nicht exprimiert wird.

### 3.8.3.8 Durchführung des BSA-Nachweises

Nachfolgend ist die Durchführung des Nachweises stichpunktartig wiedergegeben:

1. Entparaffinieren in Xylol 10 min  
Spülen in absteigender Alkoholreihe, zweimal spülen in VE-Wasser
2. Proteolytische Enzymverdauung oder Hitzevorbehandlung c.a. 20 min
3. Blocken der endogenen Peroxidase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung 10 - 15 min
4. Spülen in TBS dreimal für insgesamt ≤ 5 min  
Abklopfen des überschüssigen Puffers, die Gegend um die Gewebe trocknen
5. Auftragen des entsprechenden Proteinblocks (nach Datenblatt) 5 - 30 min
6. Überflüssige Flüssigkeit entfernen oder Waschen in TBS, dreimal für insgesamt 5 min  
(Angabe laut Datenblatt)
7. Auftragen des ersten spezifischen Antikörpers (primärer Antikörper),  
zur Inkubation am gleichen Tag in einer feuchten Kammer bei Raum-  
temperatur (variiert je nach Hersteller) 45 min
8. Waschen in TBS, dreimal für insgesamt ≤ 10 min  
überschüssigen Puffer abklopfen, die Gegend um die Gewebe trocknen
9. Auftragen der biotinylierten Antikörper-Lösung (sekundärer Antikörper/ Link  
Link) bei Raumtemperatur in feuchter Kammer 20 min  
  
sekundärer Antikörper 30 min
10. Waschen in TBS, dreimal für insgesamt ≤ 5 min  
überschüssigen Puffer abklopfen, die Gegend um die Gewebe trocknen



11. Auftragen der Streptavidin-Peroxidase-Lösung (tertiärer Antikörper/  
Label) bei Raumtemperatur in feuchter Kammer 20 - 30 min
12. Waschen in TBS, dreimal für insgesamt ≤ 5 min  
überschüssigen Puffer abklopfen, die Gegend um die Gewebe trocknen
13. Inkubieren in Diaminobenzidin-Lösung (DAB) unter mikroskopischer  
Kontrolle ≤ 30 min
14. Waschen in VE-Wasser ≤ 30 min
14. Waschen in VE-Wasser ≤ 5 min
15. Gegenfärben mit Hämalaun nach Mayer [65] 30 – 60 sec
16. Abspülen der überschüssigen Farbe in VE-Wasser
17. Wässern in Leitungswasser ≤ 10 min
18. Spülen in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol
19. Eindecken in Eukitt.

**Ergebnis** : Positive Reaktion erscheint gold- bis dunkelbraun.

### 3.8.3.9 Auswertung

Die Schnitte wurden am Lichtmikroskop (Zeiss, Jena/D) auf ein positives Färbeergebnis der Zielstruktur bei möglichst geringer Hintergrundfärbung untersucht und qualitativ ausgewertet. Das Färbeergebnis wurde fotografisch mit Hilfe der Software Axioversion und geeigneten Objektiven (Zeiss, Jena/D) festgehalten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ökotoxikologische Tests

#### 4.1.1 21-Tage Reproduktionstoxizitätstest mit Levonorgestrel

##### 4.1.1.1 Gehaltsanalytik Levonorgestrel

Die gemessenen Konzentrationen unterschieden sich in beiden Studien mit Levonorgestrel deutlich von den Nominalkonzentrationen, es wurden im Mittel nur etwa ein Drittel der eingesetzten Konzentrationen wiedergefunden (Tab. 4.1). In den Testlösungen aus den Aquarien des Reproduktionstests wurden im Mittel 0,8 (2 ng/L) 3,3 (20 ng/L) und 30 (100 ng/L) gemessen. In beiden Studien steigerte sich die Wiederfindung vom Beginn zum Ende des Expositionszeitraumes. Die mittleren gemessenen Konzentrationen im Zwei-Generationen-Test betragen während der Aufzucht der ersten Generation 0,7 (nominal 5 ng/L); 22 (nominal 50 ng/L) und 30 (nominal 100 ng/L). Nach dem Umsetzen der adulten Fischpaare in ein neues Testsystem und während der Schlupfphase der F<sub>1</sub> war die Testsubstanz trotz einer Sättigungsphase nicht oder nur zu <3% nachweisbar. Die Stammlösungen beider Studien hatten dagegen eine mittlere Wiederfindung von 84% und waren stabil über den Expositionszeitraum. Die Validierung der Methode mit dotierten Proben ergab eine Wiederfindung von >92%.

Tabelle 4.1: Übersicht über die mittlere Wiederfindung der Testsubstanz LNG in Reproduktionstests und Zwei-Generationen-Test. n.d.= nicht detektierbar.

|                   | Konzentration (ng/L, nominal) |      |     |     |      |      |      |       |
|-------------------|-------------------------------|------|-----|-----|------|------|------|-------|
|                   | 0,2                           | 1,0  | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 50,0 | 100,0 |
| Wiederfindung (%) | n.d.                          | n.d. | 40  | 14  | 17   | 17   | 44   | 31    |

#### 4.1.1.2 Abiotische Parameter

Die Menge an gelöstem Sauerstoff in den Testbecken lag in allen Tests über die gesamte Versuchsdauer zwischen 6,6 und 8,2 mg/L (> 60% des Luftsättigungswertes), der pH-Wert lag zwischen 7,7 und 8,3 und die Temperatur war in sämtlichen Aquarien im Bereich von 25±1°C.

#### 4.1.1.3 Reproduktionserfolg Levonorgestrel

Die Exposition der Fische gegenüber dem synthetischen Gestagen Levonorgestrel resultierte in Abhängigkeit von der getesteten Konzentration (0,2 – 100,0 ng/L nominal) in unterschiedlich starker Beeinträchtigung des Reproduktionserfolges. Eine Übersicht über die beobachteten Parameter gibt Tabelle 4.2.

Tabelle 4.2: Ergebnisübersicht aus drei Reproduktionstests mit verschiedenen getesteten Konzentrationen der Prüfsubstanz LNG.

|                              | nominale Konzentration (ng/L) |     |   |    |    |     |
|------------------------------|-------------------------------|-----|---|----|----|-----|
|                              | Kontrolle                     | 0.2 | 1 | 10 | 20 | 100 |
| Hemmung Eiablage             | -                             | x   | x | x  | x  | x   |
| Stillstand Eiablage          | -                             | -   | - | -  | x  | x   |
| Fehlendes Brutverhalten (♂)  | -                             | x   | x | x  | x  | x   |
| Vergrößerter Bauchumfang (♀) | -                             | -   | x | x  | x  | x   |
| Vermännlichung (♀)           | -                             | -   | - | -  | -  | x   |

Eine 21-Tage-Dosisfindungsstudie mit 1, 10 und 100 ng/L zeigte schon bei der niedrigsten Konzentration von 1 ng/L deutliche reproduktionstoxische Effekte. Die Eiablage kam nach etwa einer Woche in allen Behandlungsgruppen zum Stillstand und die Weibchen der höchsten Konzentrationsgruppe zeigten eine Maskulinisierung der sekundären Geschlechtsmerkmale wie die De-novo-Synthese von Nuptialtuberkeln und eine dunkle

Pigmentierung (Abb. 4.1). Die Männchen zeigten neben latent aggressivem Verhalten keine morphologischen Veränderungen.

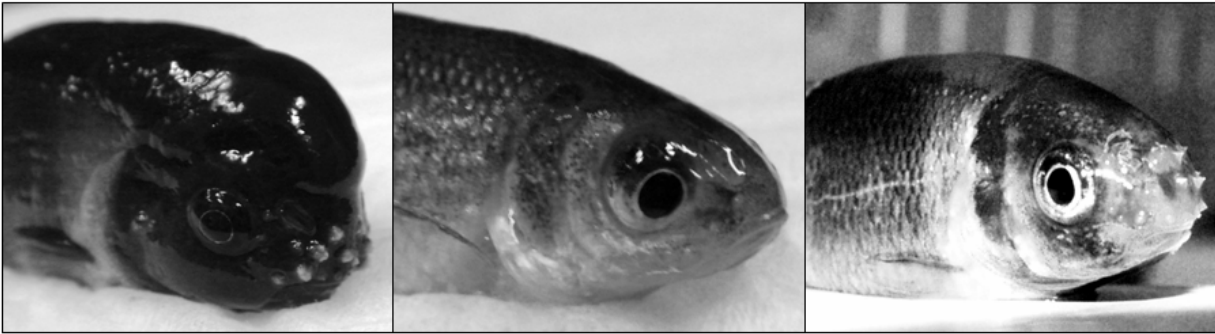


Abbildung 4.1: Sekundäre Geschlechtsmerkmale: A: Kontroll-Männchen; B: Kontroll-Weibchen; C: maskulinisiertes Weibchen mit Nuptialtuberkeln nach Exposition gegenüber 100 ng/L LNG (nominal).

Die Testkonzentrationen der definitiven Studie wurden aufgrund der schlechten Wiederfindung der Substanz in den Testaquarien auf 2, 20 und 100 ng/L erhöht. Auch hier zeigte sich in allen Behandlungsgruppen ein signifikanter Rückgang der Eiablage im Laufe der Expositionsphase ( $p < 0,0001$ , Abb. 4.2). Abbildung 4.3 zeigt eine Aufschlüsselung der Eiablage pro Woche während der Expositionsphase. Es ist zu erkennen, dass in der dritten Woche die Eiablage vollständig zum Stillstand kommt, während die Kontrolle relativ gleichmäßig laicht.

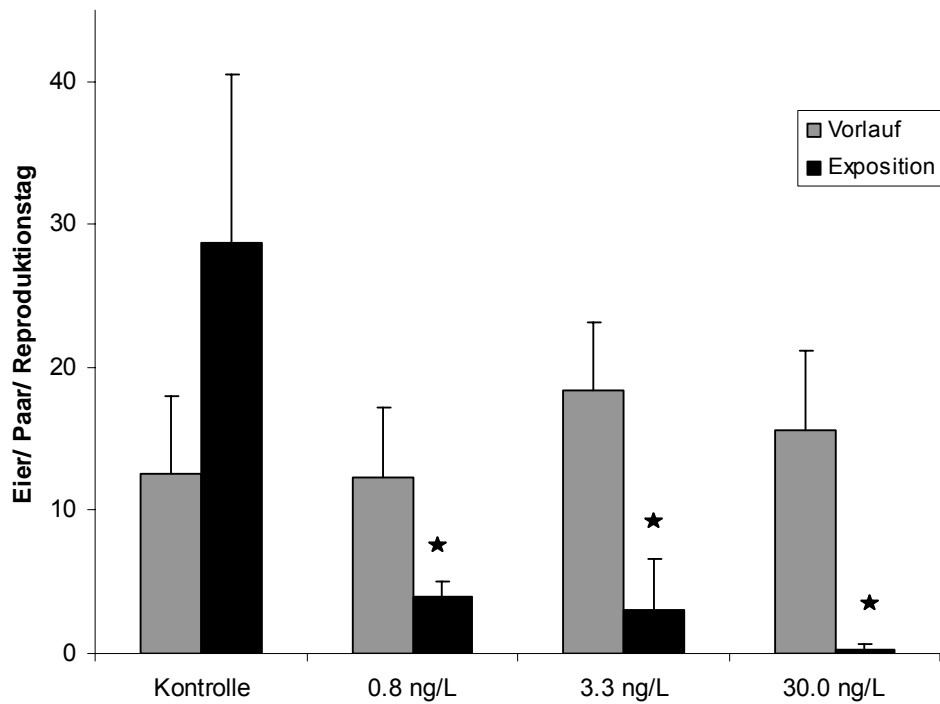


Abbildung 4.2: Reproduktive Effekte von Levonorgestrel, Eiablage; Vorlauf- und Expositionsphase, 0,8-30,0 ng/L (gemessene Konzentrationen). Für alle  $p < 0,0001$  im Vergleich zur Kontrolle.

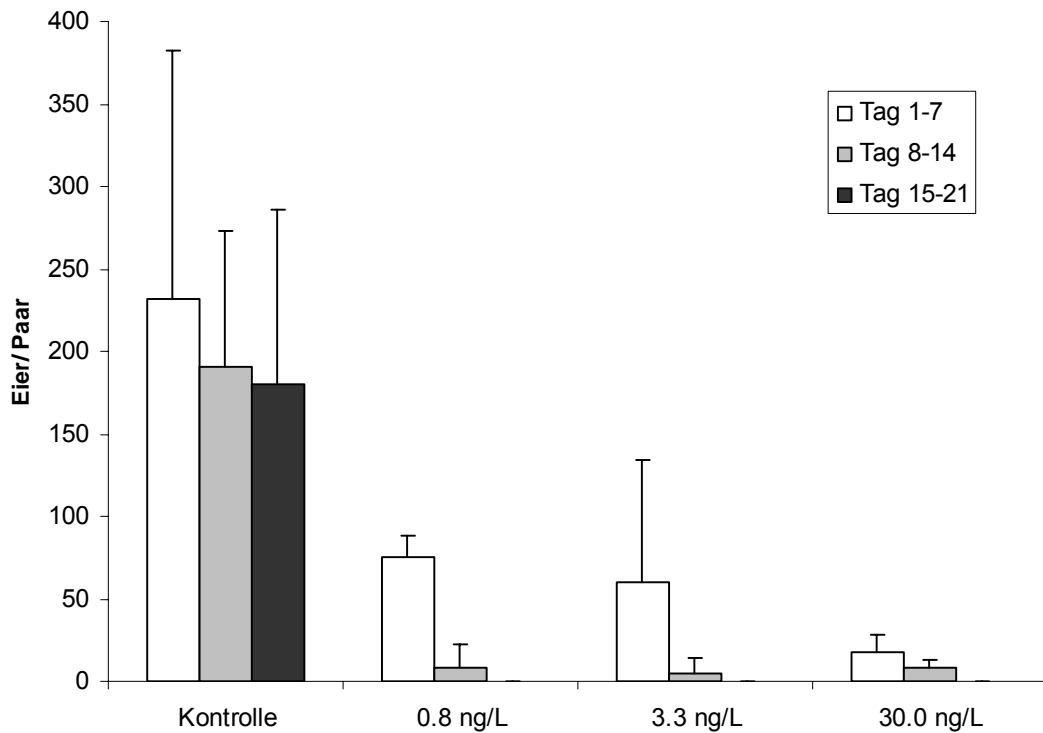


Abbildung 4.3: Reproduktive Effekte von Levonorgestrel: Eier pro Paar und Woche der Expositionsphase, weiß: Tag 1-7, grau: Tag 8-14, schwarz: Tag 15-21; (gemessene Konzentrationen).

#### **4.1.1.4 Gonadenhistologie Levonorgestrel**

Die Abbildung 4.4 zeigt die Gonaden der definitiven Studie mit 0,8, 3,3 und 30,0 ng/L. Die Untersuchung der Gonaden zeigte endokrine Effekte auf die weiblichen sowie der männlichen Reproduktionsorgane.

Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.4; A) war bei den Weibchen in der höchsten Dosis eine 8,7-fache Zunahme des Anteils atretischer Follikel und eine Verdoppelung des Anteils reifer Oocyten zu beobachten, während sich der Anteil der primären Oocyten halbierte (Tab.4.3). Die Ovarien waren überfüllt mit reifen oder schon degenerierenden Follikeln, was sich auch in einem erhöhten Bauchumfang zeigte (Abb. 4.4; B).

Die männlichen Fische zeigten im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.4; C) eine Zunahme reifer Spermatozoen und größere Hoden (Abb. 4.4; D). Bei der höchsten Dosis erschienen die Tubuli vergrößert und deren Lumen war gefüllt mit reifen Spermatozoen. Das Keimepithel war verdickt, wodurch das interstitielle Gewebe zusammengedrückt erschien. Dieser Druck erzeugte daher eine Atrophie der interstitiellen Sertoli- und Leydig-Zellen. Die mittlere Anzahl der Spermazocysten pro Gesichtsfeld nahm von der Kontrolle zur höchsten Dosis von 98,0 auf 58,5 ab. Eine Verschiebung des relativen Anteils der einzelnen Stadien konnte nicht beobachtet werden. Allerdings war die Anzahl untersuchter Schnitte pro Gruppe zu niedrig, um eine statistische Auswertung zu erlauben.

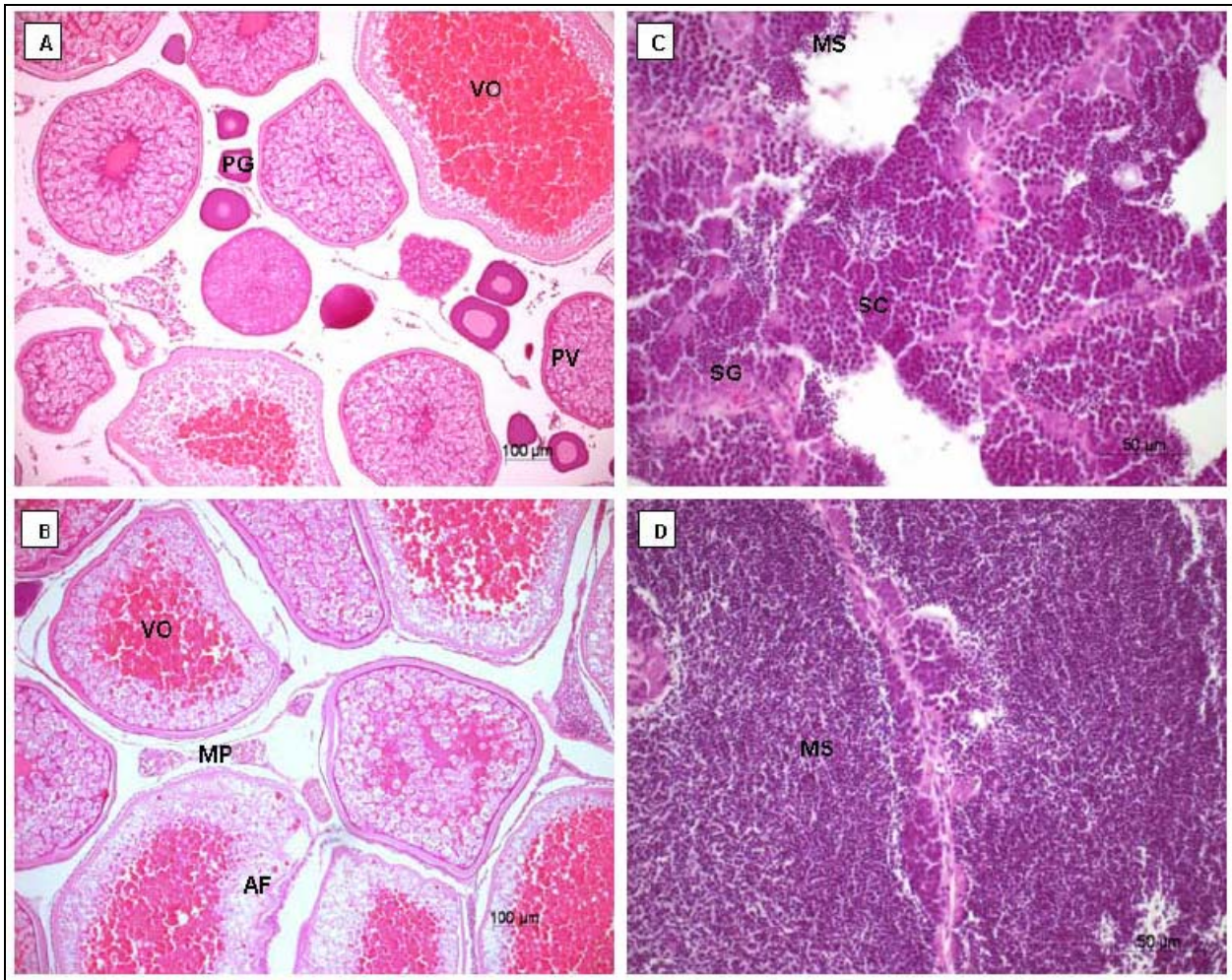


Abbildung 4.4.: Histologie der Gonaden; A: Schnitt eines Kontroll-Ovars; B: nach Exposition gegenüber 30 ng/L LNG; C: Hoden eines Kontroll-Männchens; D: Nach Exposition gegenüber 30 ng/L LNG. PG= Primäre Oocyten, PV= Prävitellogene Oocyte, VO= Vitellogene/ reife Oocyte, AF= präovulatorischer atretischer Follikel, MP= Makrophagen, SG= Spermatogonien, SC= Spermatocyten, MS= reife Spermatozoen.

Tabelle 4.3: Ovarien von Weibchen der Kontrolle und höchsten Dosis LNG; Anteil der verschiedenen Reifestadien (%). Die niedrige und mittlere Konzentration wurde nicht untersucht.

|                        | Kontrolle | 30 ng/L |
|------------------------|-----------|---------|
| Primäre Oocyten        | 58,0      | 29,8    |
| Prävitellogene Oocyten | 24,1      | 30,6    |
| Vitellogene Oocyten    | 17,2      | 33,5    |
| Atretische Follikel    | 0,7       | 6,1     |

#### **4.1.2 Zwei-Generationen-Test mit Levonorgestrel**

Um die sensitivsten Phasen im Leben eines Fisches gegenüber der Exposition mit synthetischen Gestagenen zu identifizieren, wurde ein Zwei-Generationen-Test mit den Endpunkten Schlupferfolg, Überleben, Länge/Gewicht, Reproduktionserfolg sowie Schlupferfolg und Länge/Gewicht der F<sub>1</sub>-Generation durchgeführt. Für diese Studie wurden befruchtete Eier von Dickkopflritzen (*Pimephales promelas*) eingesetzt und über den gesamten Lebenszyklus (vom <24h alten Ei bis zur F<sub>1</sub>) mit Levonorgestrel behandelt.

##### **4.1.2.1 Gehaltsanalytik**

Die gemessenen Konzentrationen unterschieden sich deutlich von den Nominalkonzentrationen: in den Testlösungen der niedrigsten Konzentration wurden 14% (0,7 ng/L) gefunden, die mittlere und höchste Dosis zeigten eine mittlere Wiederfindung von 44,0% (22,0 ng/L) und 29,7% (29,7 ng/L). In allen Proben stieg die Wiederfindung zum Ende des Expositionszeitraumes an. Die Stammlösungen zeigten eine ausreichende Wiederfindung (>100%) und waren stabil über den Expositionszeitraum.

##### **4.1.2.2 Schlupferfolg**

Am Tag 5 nach Einsetzen des befruchteten Laiches waren die entwickelten Eier aller Gruppen geschlüpft. Die Schlupfrate war in allen Gruppen größer als 66%, so dass die Validität des Tests als gewährleistet angesehen werden konnte (Abb. 4.5). Es zeigten sich geringe, jedoch nicht dosisabhängige Unterschiede (Mittelwerte Kontrolle 77,5%; niedrigste Dosis 70%; mittlere Dosis 79,5% und höchste Dosis 81,7%). Die Mortalität während der Aufzuchtphase war am Tag 30 n.S. in allen Gruppen <30%, (Kontrolle 13%; niedrigste Dosis 15,8%; mittlere Dosis 12,8% und höchste Dosis 11,5%).



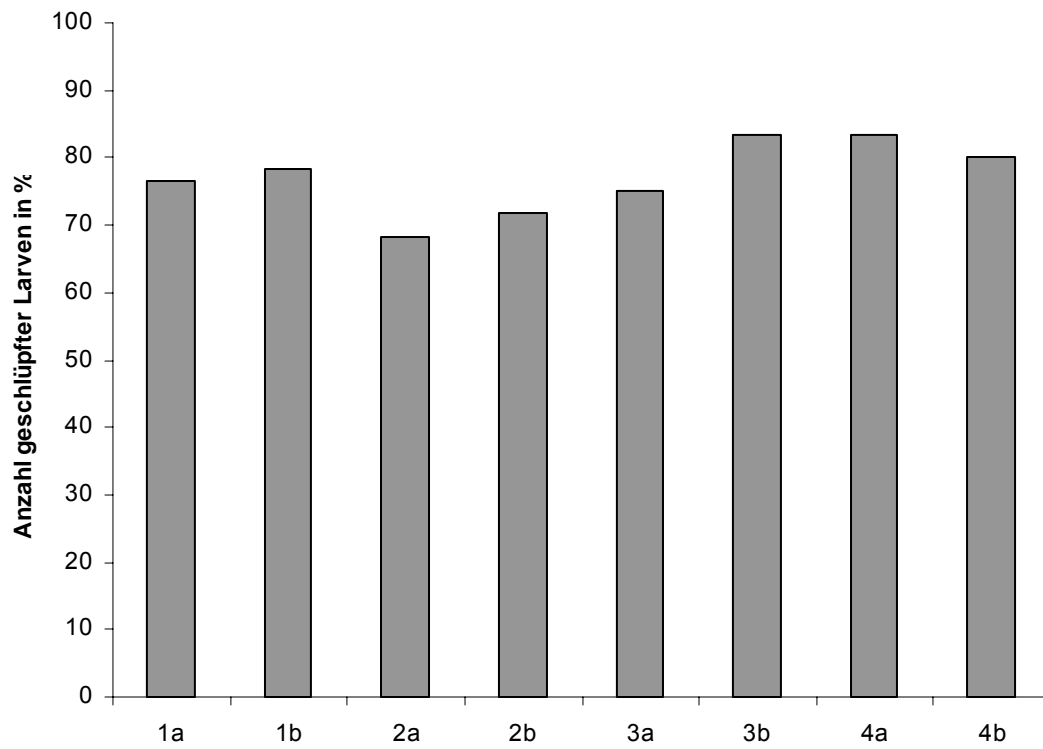


Abbildung 4.5: Schlupferfolg der eingesetzten Eier unter Behandlung mit LNG in %, je zwei Zylinder (a,b) pro Konzentration. Gruppe 1 (LW-Kontrolle), Gruppe 2 (0,7 ng/L), Gruppe 3 (22,0 ng/L), Gruppe 4 (29,7 ng/L).

### 4.1.2.3 Längen- und Gewichtsentwicklung

Die Längen- und Gewichtsentwicklung und der aus Gewicht und Länge der Fische gebildete Konditionsfaktor (CF) zeigten an Tag 30 und 56 keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den drei Behandlungsgruppen 0,8, 22,0 und 29,7 ng/L. Bei den adulten Fischen am Expositionsende (Tag 160) war ein signifikanter Anstieg von Länge und Gewicht der mittleren und höchsten Konzentration gegenüber der Kontrolle zu beobachten (Länge/Gewicht  $p=0,028/0,025$  und  $0,0087/0,005$ ), während sich die niedrigste Konzentration nicht von der Kontrolle unterschied (Länge/Gewicht  $p=0,92/0,85$ ), (Abb. 4.6). Der CF in der Gruppe 3 (22,0 ng/L) war allerdings zu allen Probenahmezeitpunkten gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Tabelle 4.4 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der  $F_0$  am Expositionsende.

Tabelle 4.4: Kumulative Mortalität, Wachstum und Geschlechterverhältnis (morphologisch/ histologisch) der  $F_0$  am Tag 160.

| Levonorgestrel ng/L<br>(gemessen) | Mortalität (%)<br>(Tag 30) | n<br>(Tag 160) | CF  | Geschlechterverh.<br>(♂:♀) | Gonadenhistologie |      |            |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------|-----|----------------------------|-------------------|------|------------|
|                                   |                            |                |     |                            | Hoden             | Ovar | Testis-Ova |
| Kontrolle                         | 13                         | 22             | 4,6 | 11:11                      | 11                | 11   | 0          |
| 0,7                               | 15,8                       | 26             | 4,8 | 17 :9                      | 17                | 9    | 0          |
| 22,0                              | 12,8                       | 22             | 5,9 | 22:0                       | 21                | 0    | 1          |
| 29,7                              | 11,5                       | 17             | 6,0 | 17:0                       | 16                | 0    | 1          |

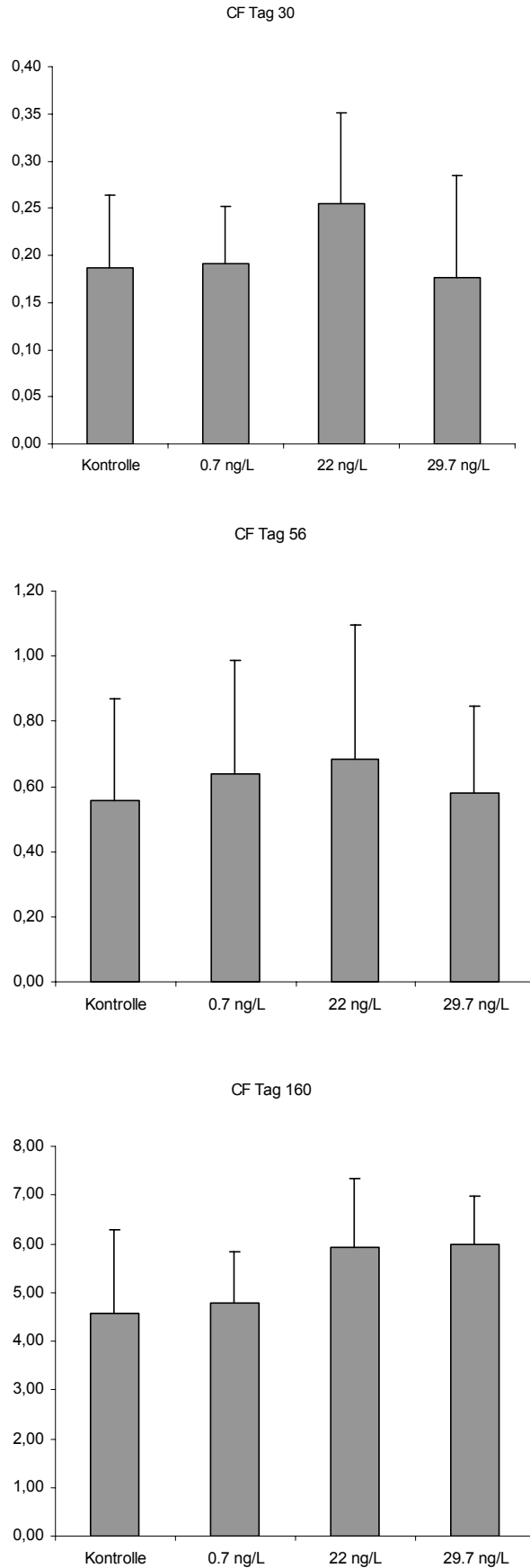


Abbildung 4.6: Konditionsfaktor CF ( $CF = \text{Gewicht (g)} / \text{Länge (mm)} \times 100$ ) der gemessenen und gewogenen Tiere im Zwei-Generationen-Test zu den drei Probenahmezeitpunkten. Oben: Tag 30, Mitte: Tag 56; Unten: Tag 160.

#### 4.1.2.4 Reproduktionserfolg nach Erlangen der Geschlechtsreife

Am Tag 117 wurden die Aquarien mit Laichhöhlen ausgestattet, da zu diesem Zeitpunkt bereits in allen Gruppen ein deutlich gefärbtes Männchen erkennbar war. Bereits in der darauf folgenden Woche konnten in den beiden Replikaten der Gruppen 1 und 2 Gelege beobachtet werden. In den Gruppen 3 und 4 besetzten zwar differenzierte Männchen die Laichhöhlen, es traten aber über den gesamten Zeitraum bis zum Tag 160 keine Gelege auf. Am Tag 139 waren in allen Gruppen ausreichend gut entwickelte Fische vorhanden, so dass die Reproduktionsphase gestartet werden konnte. Wie Abb. 4.7 zeigt, stellte sich bei den vier Paaren der Kontrolle (Gr.1) eine regelmäßige Reproduktion von durchschnittlich 22 Eiern pro Tag ein. In Gruppe 2 zeigte sich trotz mehrmaligen Austausches der Fische nur bei drei von vier Paaren ein unregelmäßiger Reproduktionserfolg (2,2 Eier/Tag). Je zwei Gelege aus den Gruppen 1 und 2 wurden für weitere vier Wochen exponiert. In der mittleren und höchsten Konzentration konnte über den gesamten Reproduktionszeitraum kein Reproduktionserfolg verzeichnet werden. Es zeigte sich, dass alle vermeintlichen Weibchen, die in der Gruppenhaltung undifferenziert erschienen, nach dem Einsetzen in die Zuchtbecken schnell männliche sekundäre Geschlechtsmerkmale entwickelten, die in der großen Aufzuchtgruppe noch unterdrückt waren. In der mittleren und höchsten Konzentration konnte am Expositionsende unter allen Fischen kein phänotypisch eindeutiges Weibchen ausgemacht werden.

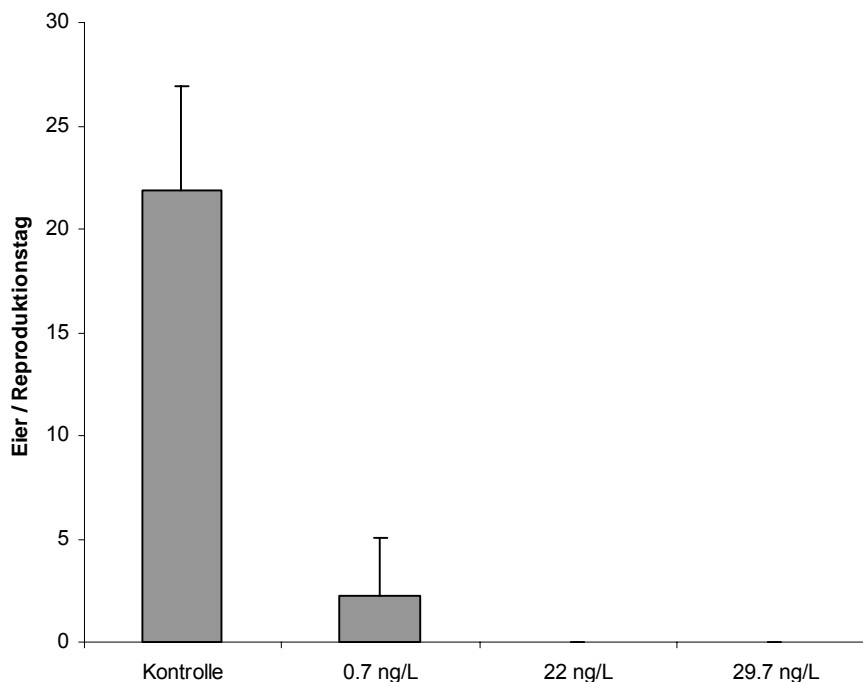


Abbildung 4.7: Reproduktionserfolg der geschlechtsreifen Tiere in der Reproduktionsphase des Zwei-Generationen-Tests unter Exposition gegenüber LNG, mittlere und höchste Dosis ohne Reproduktionserfolg.

#### 4.1.2.5 Schlupferfolg der F<sub>1</sub>

Die Schlupfrate der Larven in der Kontrolle war mit durchschnittlich 90% normal. Die Mortalität bis zum Tag 28 lag bei 13%. Dagegen fiel die Schlupfrate in der Gruppe 2 signifikant schlechter aus (Abb. 4.8), von den 60 eingesetzten Eiern schlüpften nur 38,3%, wovon 83,33% nicht bis zum Tag 28 überlebten.

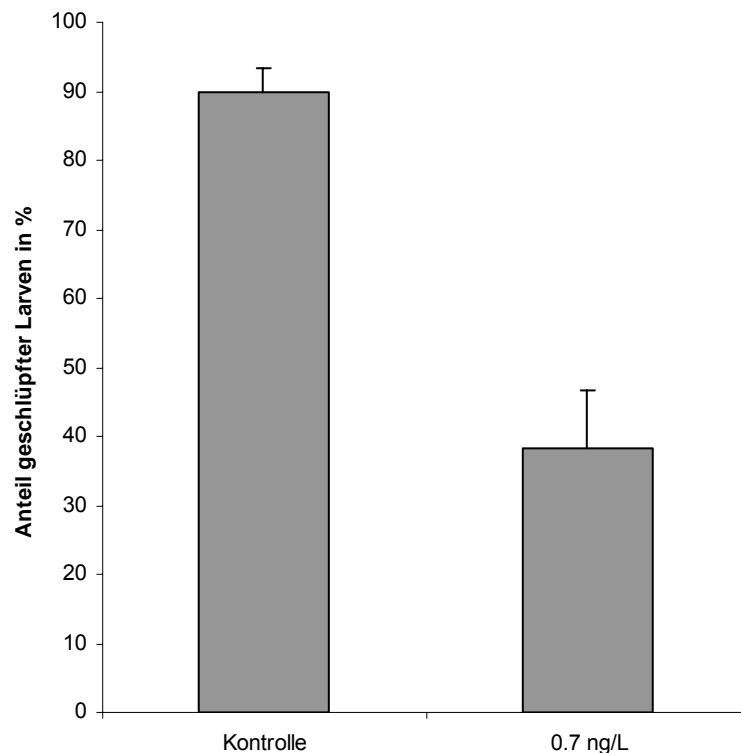


Abbildung 4.8: Schlupferfolg der F<sub>1</sub> im Zwei-Generationen-Test; Kontrolle (1a, b) und 0,7 ng/L LNG (2a, b).

#### 4.1.2.6 Geschlechterverhältnis

##### 4.1.2.6.1 Morphologisch

Phänotypisch betrachtet zeigte die Kontrolle am Expositionsende Männchen und Weibchen zu gleichen Anteilen. Von den 22 Fischen waren 11 als Männchen und 11 als Weibchen zu erkennen. In der Gruppe 2 (0,7 ng/L) konnten von insgesamt 26 Tieren 17 als Männchen und 9 als Weibchen eingestuft werden. In der mittleren und höchsten Konzentration (22,0 und 29,7 ng/L) waren morphologisch ausschließlich Fische mit männlichen sekundären Geschlechtsmerkmalen zu beobachten.

Abbildung 4.9 zeigt je Gruppe ein Paar der Fische aus der Reproduktionsphase am Expositionsende. Während die Kontrollfische geschlechtsspezifisch normale sekundäre Geschlechtsmerkmale aufwiesen, waren bei den behandelten Tieren Veränderungen zu beobachten. Das Kontroll-Männchen zeigte eine deutliche, dunkle Pigmentierung von Haut und Flossen, ein normal entwickeltes craniales Fatpad und Nuptialtuberkel. Das Weibchen war silbrig, schlanker geformt und ohne sichtbare dunkle Pigmentierung oder sonstige männliche Merkmale. In der niedrigsten Konzentration war das Männchen normal entwickelt, wohingegen beim Weibchen vor allem ein vergrößerter Bauchumfang sichtbar war (Abb. 4.9, B). Die mittlere Konzentration bewirkte beim Weibchen sowohl den vergrößerten Bauchumfang als auch eine morphologische Vermännlichung in Form von dunklerer Pigmentierung der Rückenflosse und der De-novo-Synthese von Nuptialtuberkeln (Abb. 4.9, C). Diese Maskulinisierung wurde in der höchsten Konzentration so deutlich, dass Männchen und Weibchen nur noch schwer zu unterscheiden waren (Abb. 4.9, D). Diese Weibchen entwickelten zusätzlich zur Pigmentierung der Haut und Flossen und den Nuptialtuberkeln auch den Ansatz eines Fatpads.

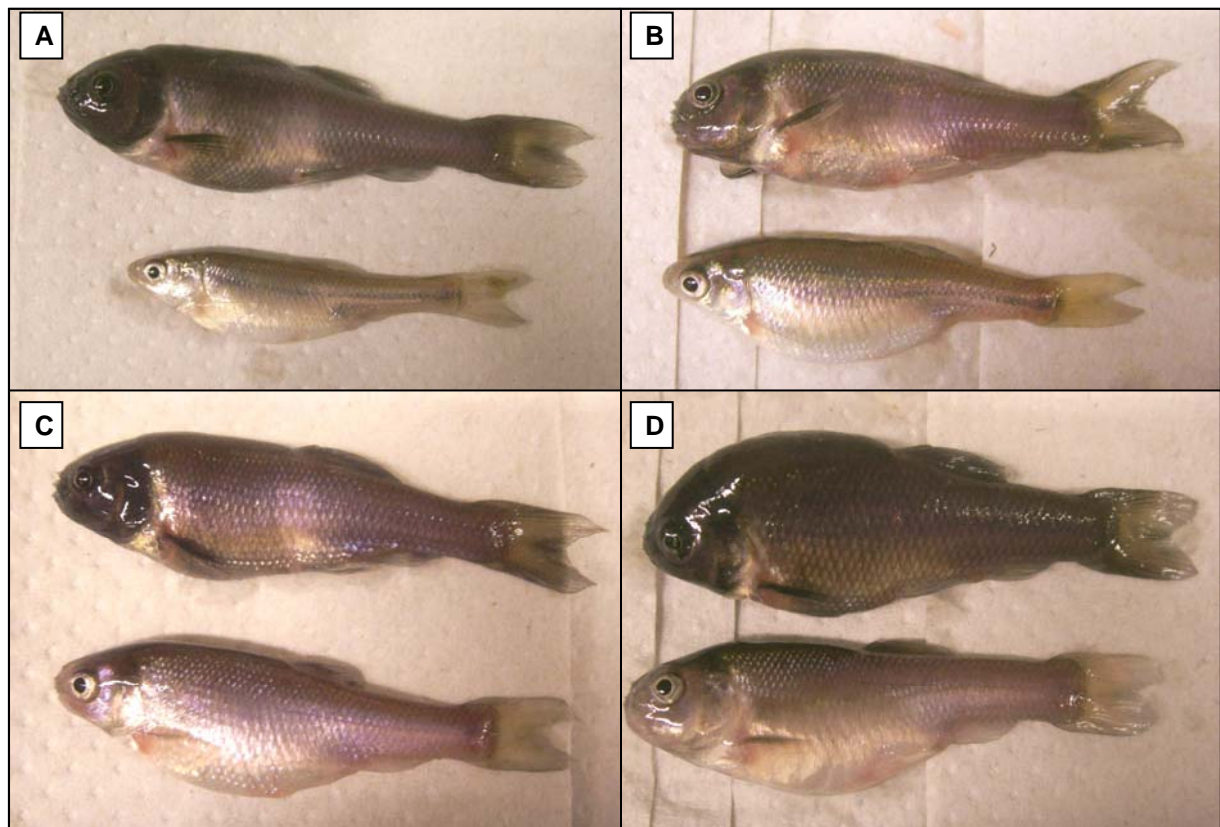


Abbildung 4.9: Ein Männchen/Weibchen jeder Konzentration am Expositionsende Tag 160 n.S. Oben: Männchen, Unten: Weibchen. A: Kontrolle; B: 0,7 ng/L, Weibchen mit vergrößertem Bauchumfang; C: 22,0 ng/L, Weibchen mit vergrößertem Bauchumfang, dunkler Rückenflosse und Nuptialtuberkeln; D: 29,7 ng/L Weibchen mit vergrößertem Bauchumfang, dunkler Rückenflosse, Fatpad-Ansatz und Nuptialtuberkeln.

#### 4.1.2.6.2 Histologisch

Die histologische Untersuchung der Gonaden sollte Aufschluss über das tatsächliche Geschlechterverhältnis geben.

Die Auswertung der am Tag 160 getöteten und präparierten Fische zeigte deutlich, dass aus der Zwei-Generationen-Exposition gegenüber Levonorgestrel eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses resultierte. War das Verhältnis von männlichen und weiblichen Fischen in der Kontrollgruppe noch 1:1, so verschob sich dieses Verhältnis mit steigender Substanzkonzentration deutlich zu männlichen sekundären Geschlechtsmerkmalen und Gonaden (Abb. 4.9 -10).

Bei drei der vier Weibchen der Gruppe 2 (0,7 ng/L) wurden am Ovar degenerative Veränderungen (atretische Follikel, interstitielle Ödeme) festgestellt. Die Gruppen 3 und 4 (22,0 und 29,7 ng/L) zeigten histologisch bis auf jeweils eine Ausnahme ausschließlich männliche Gonaden. Diese einzelnen Tiere hatten Testes-Ova (Oocyten und Hodengewebe) entwickelt (Abb. 4.11-13). Außerdem zeigten einige Männchen der Gruppen 3 und 4 noch unreife Hoden. Dies deutet auf eine unterschiedlich stark ausgeprägte Vermännlichung der weiblichen Tiere hin.

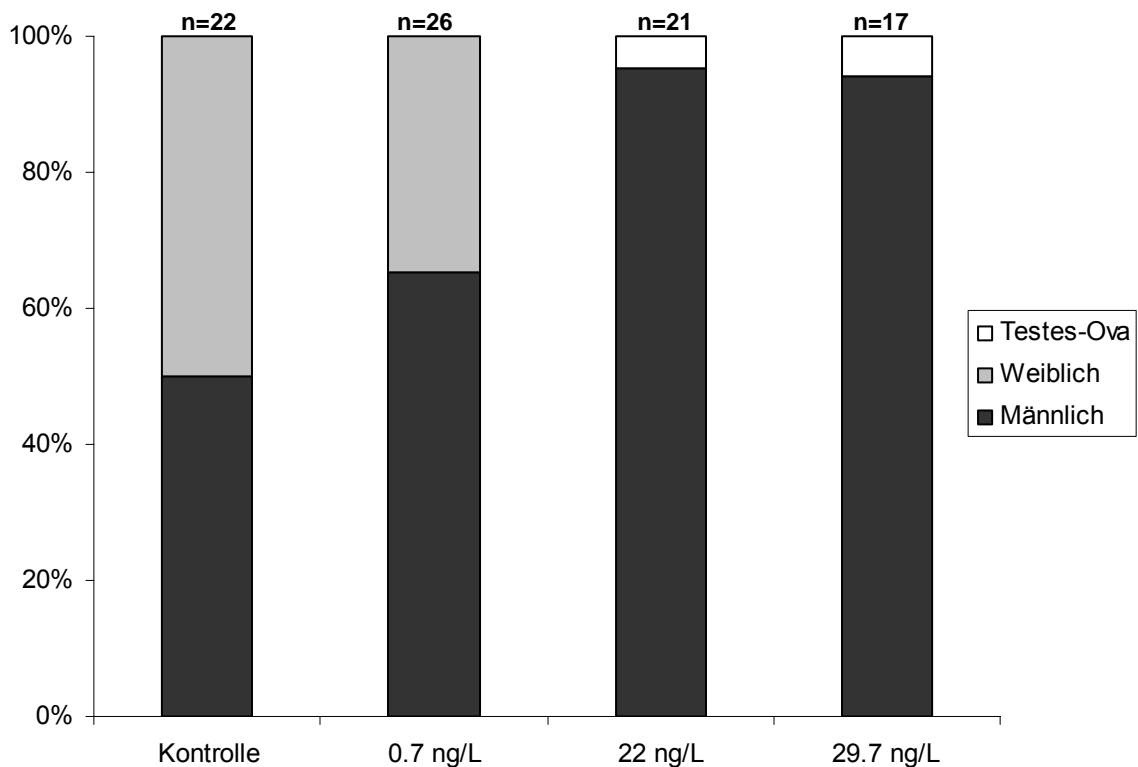


Abbildung 4.10: Histologische Bestimmung des Geschlechterverhältnisses der adulten Fische am Expositionsende des Zwei-Generationen-Tests (Tag 160 nach Schlupf).

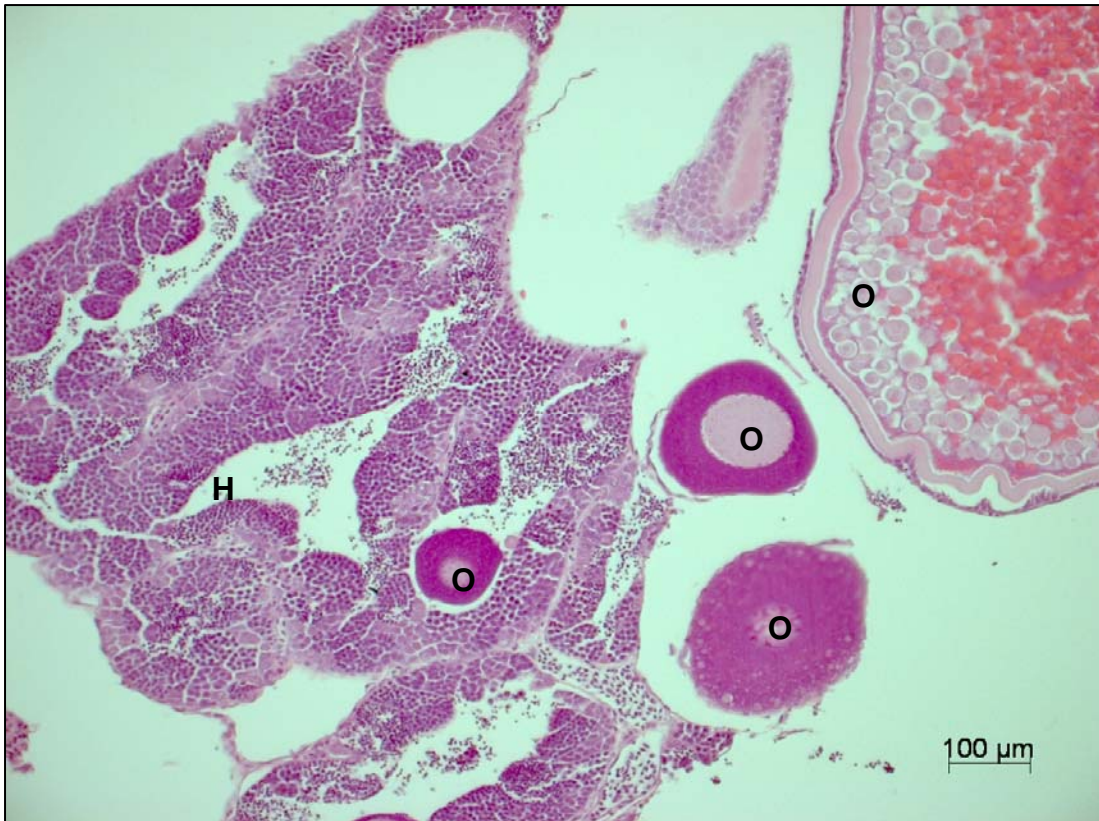


Abbildung 4.11: Zwei-Generationen-Test; Ovar eines mit 22 ng/L LNG behandelten Weibchens; O= Oocyten, H= Hodengewebe



Abbildung 4.12: Zwei-Generationen-Test; Ovar eines mit 22 ng/L LNG behandelten Weibchens; S= reife Spermatozoen (Vergrößerung x 40)



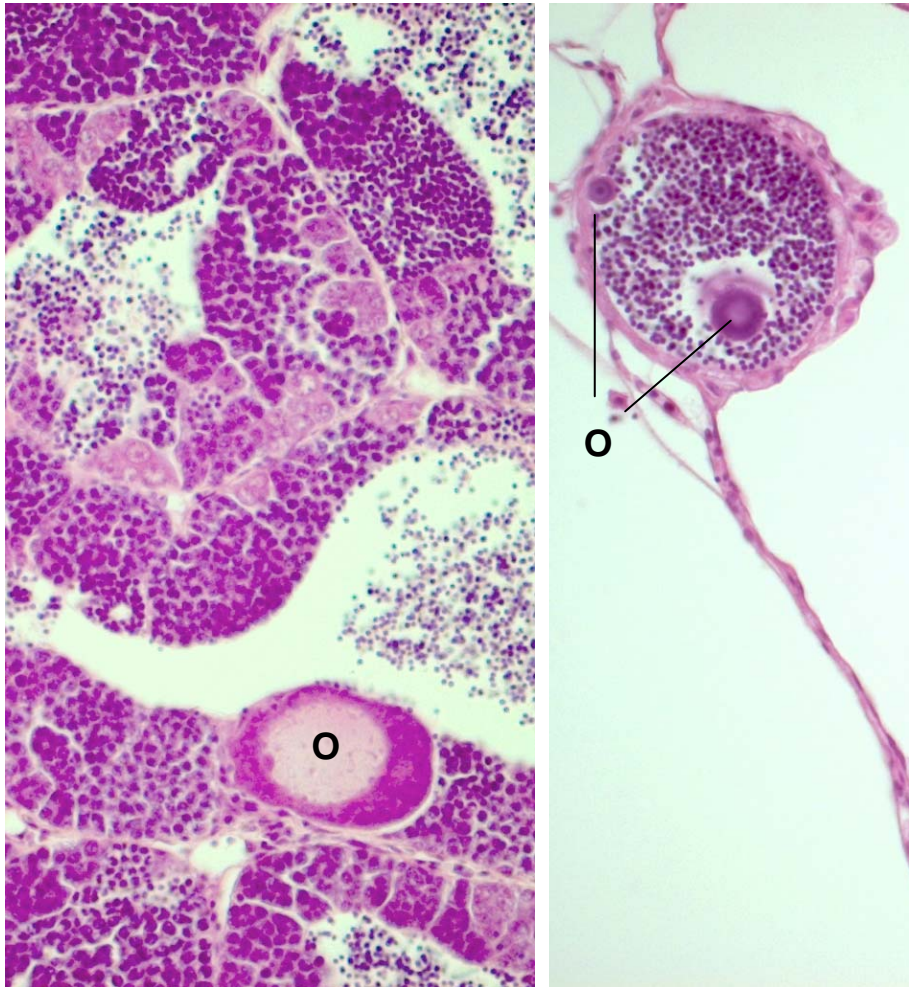


Abbildung 4.13: Zwei-Generationen-Test; Hodengewebe von Fischen mit prävitellogenen Oocyten (=O) nach Behandlung mit 29,7 ng/L LNG am Tag 160 nach Schlupf (Vergrößerung x 20).

### **4.1.3 21-Tage Reproduktionstoxizitätstest mit Dienogest**

#### **4.1.3.1 Gehaltsanalytik Dienogest**

Die gemessenen Konzentrationen der Testlösungen unterschieden sich von den Nominalkonzentrationen, sie zeigten eine Wiederfindung zwischen 51% und 65%. Die mittleren gemessenen Konzentrationen waren 65, 293 und 510 ng/L für die nominalen 100, 500 und 1000 ng/L. Die Stammlösungen zeigten eine ausreichende Wiederfindung (83-93%) und waren stabil über den Expositionszeitraum.

#### **4.1.3.2 Abiotische Parameter**

Die Menge an gelöstem Sauerstoff in den Testbecken lag über die gesamte Versuchsdauer zwischen 6,6 und 8,0 mg/L (> 60% des Luftsättigungswertes), der pH-Wert lag zwischen 7,7 und 8,3 und die Temperatur war in sämtlichen Aquarien im Bereich von  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### **4.1.3.3 Reproduktionserfolg Dienogest**

Wie auch bei Levonorgestrel beobachtet, ging die Reproduktion in der mittleren und höchsten Dosis deutlich zurück, allerdings bei deutlich höheren Konzentrationen. Bei der niedrigsten getesteten Dosis (nominal 100 ng/L, gemessen 65 ng/L) war kein signifikanter hemmender Effekt auf die Reproduktion festzustellen, da die Eiablage innerhalb der Gruppe für die statistische Auswertung zu stark schwankte. Verglichen mit der Kontrolle zeigte sich zudem auch kein hemmender Effekt, so dass hier nicht davon auszugehen ist, dass diese Konzentration die Reproduktion beeinträchtigt. Allerdings waren auch in der Kontrolle starke Schwankungen in der Eiablage zu verzeichnen (Abb. 4.14-15). Für die Anzahl Eier pro Gelege der mittleren und hohen Dosisgruppe (nominal 500 und 1000 ng/L; gemessen 293 und 518 ng/L) wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ( $p=0,0394$  und  $p=0,0054$ ), (Abb. 4.14). Die statistische Analyse der Anzahl der abgelegten Eier pro Paar war in der höchsten Konzentration nicht schlüssig ( $p=0,20$ ), obwohl die Eiablage deutlich zurückgegangen war.

Generell war die Anzahl abgelegter Eier pro Tag (Bruterfolg) in allen Gruppen auch schon in der Vorlaufphase gering (durchschnittlich 4-16 Eier/Tag).

Außerdem war wiederholt fehlendes Brutverhalten und eine zunehmende Aggressivität bei den Männchen zu beobachten. Die Weibchen entwickelten zeitweilig eine dunklere Pigmentierung der Haut und Flossen und einen vergrößerten Bauchumfang. Der Lösungsvermittler Triethylenglycol hatte keine Effekte auf die Fitness oder den Reproduktionserfolg der Kontrolltiere, da die mittlere Eiablage bei 10 Eier/Tag lag und somit den vorgeschlagenen Referenzwerten der OECD Richtlinie [56] entsprach.

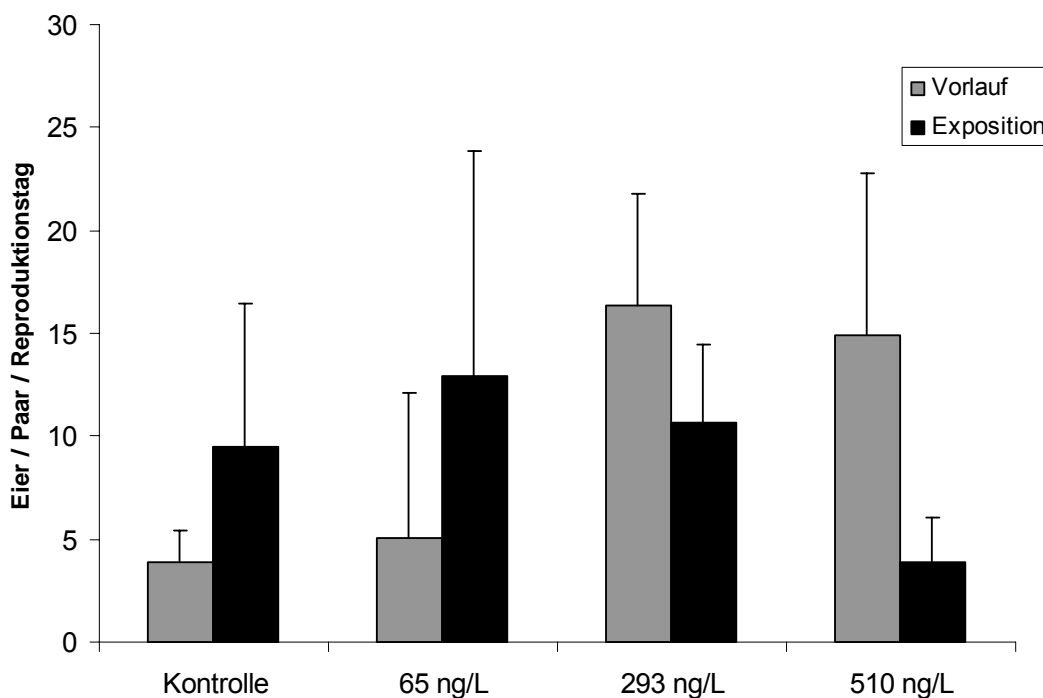


Abbildung 4.14: Reproduktive Effekte von Dienogest: Mittlere Anzahl Eier pro Gelege in der Vorlauf- und Expositionsphase, 65 - 510 ng/L (gemessen). Links: Vorlaufphase, Rechts: Expositionsphase.

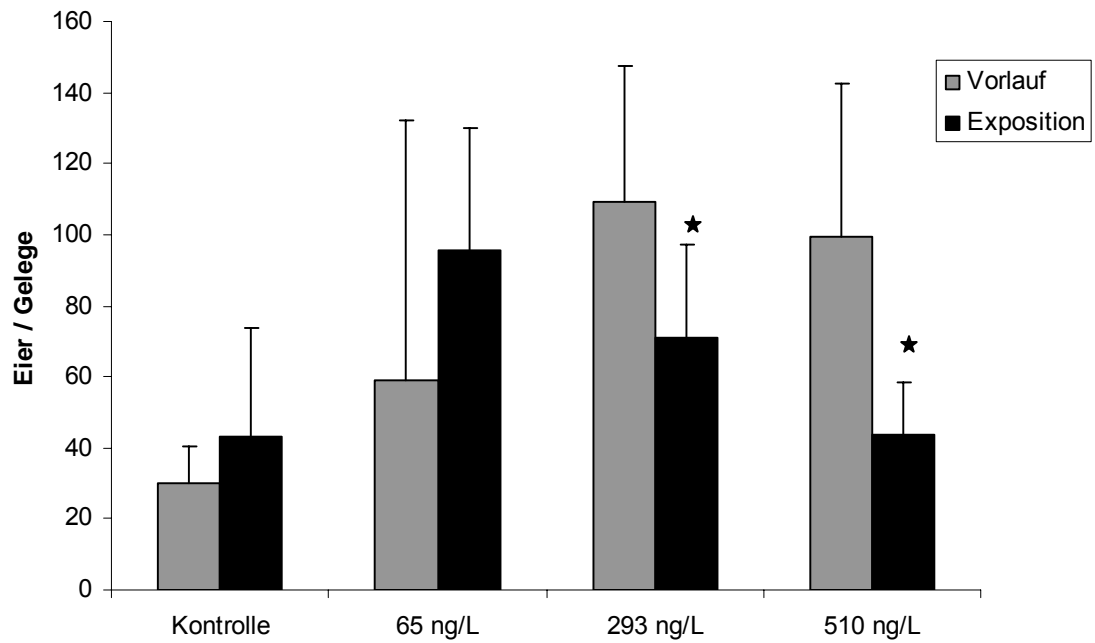


Abbildung 4.15: Reproduktive Effekte von Dienogest: Anzahl Eier pro Gelege, links: Vorlaufphase, rechts: Expositionphase;  $p(293 \text{ ng/L})=0,0394$  und  $p(510 \text{ ng/L})=0,0054$ .

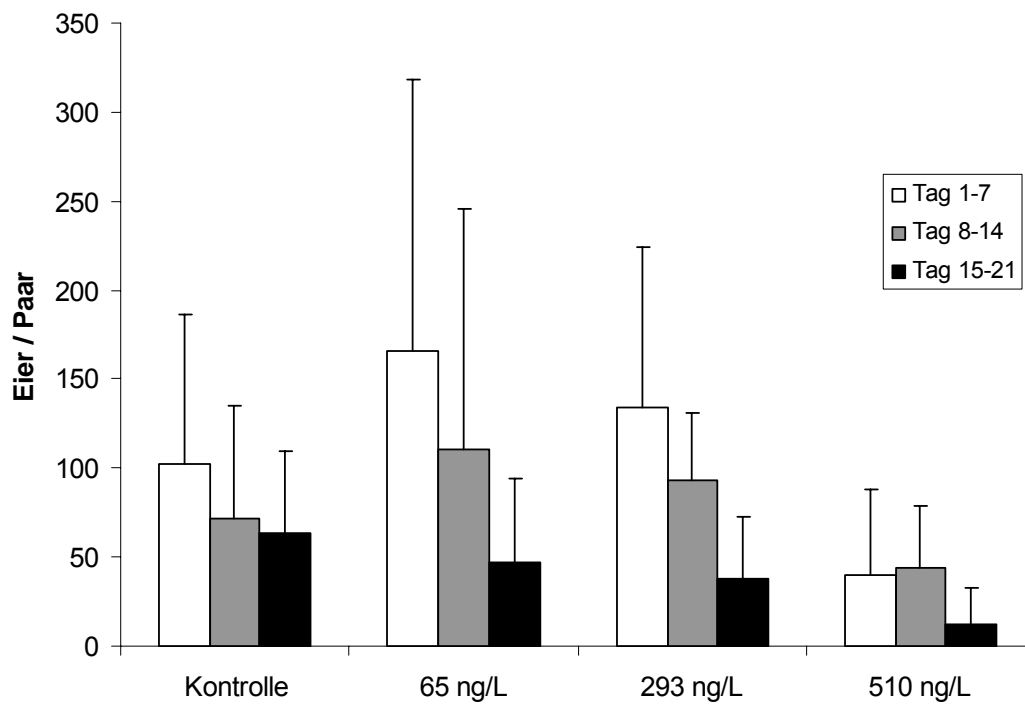


Abbildung 4.16: Reproduktive Effekte von Dienogest: Anzahl Eier pro Paar und Woche der Expositionphase, weiß= Tag 1-7, grau= Tag 8-14, schwarz= Tag 15-21.

#### 4.1.3.4 Gonadenhistologie Dienogest

Alle mit Dienogest behandelten Weibchen zeigten vergrößerte Ovarien und einen etwa gleichen Anteil atretischer Follikel. Hierbei war die Aktivität von Makrophagen und verschiedene apoptotische und nekrotische Prozesse wie die Degeneration der folliculären Wände zu beobachten. Im Vergleich mit der Kontrolle zeigte die histomorphometrische Evaluierung der höchsten Behandlungsgruppe einen 30-fach höheren Anteil an degenerierenden atretischen Follikeln ("pre-ovulatory atretic follicles", POAF's) und einen um die Hälfte (Faktor 2,2) geringeren Anteil reifer Oocyten (Tab. 4.4). Hierbei ist anzumerken, dass der relative Anteil der verschiedenen Reifestadien der niedrigsten Behandlungsgruppe (deren Reproduktion nicht signifikant gehemmt zu sein schien), sich nicht von den anderen Behandlungsgruppen unterschied.

Die Hoden der behandelten männlichen Fische erschienen im Vergleich zur Kontrolle vergrößert und deren Lumen war gefüllt mit reifen Spermatozoen (Abb. 4.17, D). Das Keimepithel war verdickt und die interstitiellen Sertoli- und Leydig-Zellen bildeten vergrößerte Nester. Die mittlere Anzahl der Spermazocysten pro Gesichtsfeld nahm von der Kontrolle zur höchsten Dosis von 65.5 auf 108.5 zu. Es konnte eine geringfügige Verschiebung des relativen Anteils der einzelnen Stadien beobachtet werden, die Anzahl der Spermatogonien nahm von der Kontrolle zur höchsten Dosis (von 26,2 auf 42,3%; Faktor 1,6) zu, während der Anteil der Spermatozyten abnahm (von 47,9 auf 31,6%; Faktor 1,5) und die reifen Spermatozoen etwa gleich blieben (von 26,2 auf 21,2%). Allerdings war die Anzahl untersuchter Schnitte pro Gruppe zu niedrig, um eine statistische Auswertung zu erlauben.

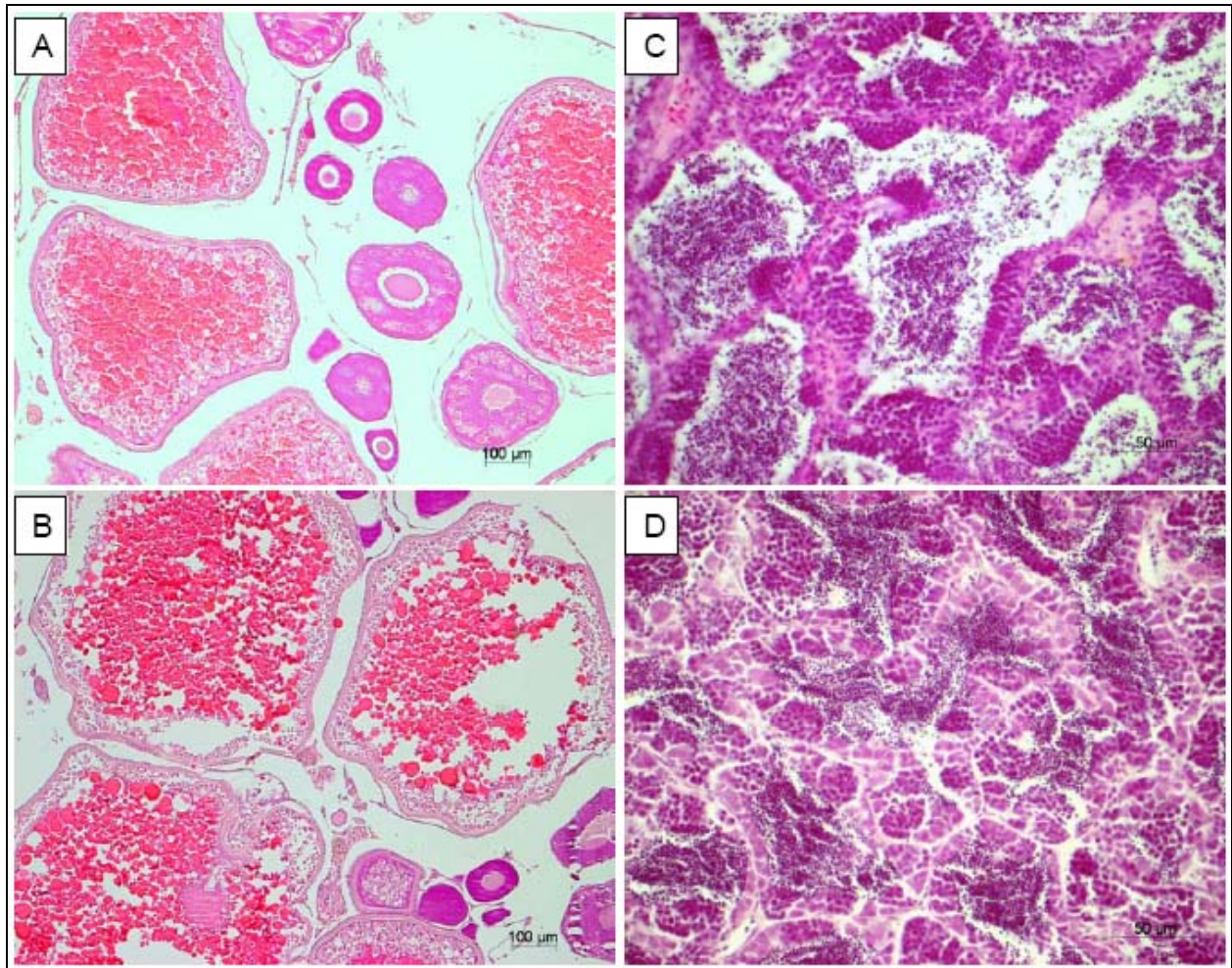


Abbildung 4.17: Histologie der Gonaden; A: Schnitt eines Kontroll-Ovars; B: nach Exposition gegenüber 510 ng/L DNG; C: Hoden eines Kontroll-Männchens; D: Nach Exposition gegenüber 510 ng/L DNG.

Tabelle 4.5: Ovarien von Weibchen der Kontrolle und der drei Konzentrationen DNG; mittlerer Anteil der verschiedenen Reifestadien (%).

|                        | Kontrolle | 65 ng/L | 293 ng/L | 510 ng/L |
|------------------------|-----------|---------|----------|----------|
| Primäre Oocyten        | 60,1      | 62,5    | 51,9     | 68,5     |
| Prävitellogene Oocyten | 25,4      | 19,0    | 25,2     | 13,0     |
| Vitellogene Oocyten    | 14,6      | 8,8     | 11,5     | 6,6      |
| Atretische Folllikel   | 0,4       | 9,8     | 11,4     | 11,9     |

#### **4.1.4 21-Tage Reproduktionstoxizitätstest mit Drospirenon**

##### **4.1.4.1 Gehaltsanalytik Drospirenon**

Die gemessenen Konzentrationen unterschieden sich deutlich von den Nominalkonzentrationen: die Testlösungen der mittleren und höchsten Dosis zeigten eine mittlere Wiederfindung von 33% (6.5 µg/L) und 35% (70 µg/L), die niedrigste Konzentration (2 µg/L) lag unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Stammlösungen zeigten eine ausreichende Wiederfindung (84-92%) und waren stabil über den Expositionszeitraum.

##### **4.1.4.2 Abiotische Parameter**

Die Menge an gelöstem Sauerstoff in den Testbecken lag über die gesamte Versuchsdauer zwischen 6,9 und 8,5 mg/L (> 60% des Luftsättigungswertes), der pH-Wert lag zwischen 7,8 und 8,4 und die Temperatur war in sämtlichen Aquarien im Bereich von 25±1°C mit Ausnahme von Tag 3, wo einige Aquarien eine Temperatur von 23,5 – 24,0 °C hatten, was jedoch keinen Einfluss auf den Test hatte.

##### **4.1.4.3 Reproduktionserfolg Drospirenon**

Im Gegensatz zu Levonorgestrel war bei der Behandlung mit Drospirenon der Rückgang der Reproduktion erst bei deutlich höheren Konzentrationen zu beobachten. Die niedrigste getestete Dosis (nominal 2 µg/L) zeigte keinen hemmenden Effekt auf die Reproduktion während die mittlere und hohe Dosierung von 6,5 und 70 µg/L in einem kompletten Stillstand der Eiablage ab Woche zwei der Exposition an resultierte. (Abb. 4.18). Außerdem war fehlendes Brutverhalten und eine zunehmende Aggressivität bei den Männchen zu beobachten. Die Weibchen entwickelten zeitweilig eine dunklere Pigmentierung der Haut und Flossen und einen vergrößerten Bauchumfang. Der Lösungsvermittler Triethylenglycol hatte keine Effekte auf die Fitness oder den Reproduktionserfolg der Kontrolltiere, da die mittlere Eiablage bei 25,5 Eiern/Tag lag und somit den Qualitätskriterien der OECD Richtlinie [56] entsprach.

Für die Eiablage der mittleren und hohen Dosisgruppe wurde ein signifikanter proportionaler Unterschied festgestellt ( $p < 0,0001$ ). Der Vergleich der Behandlungsgruppen mit der Kontrolle waren ebenso statistisch signifikant für die mittlere ( $p = 0,0005$ ) und hohe Dosisgruppe ( $p = 0,0001$ ), (Abb. 4.18-19).

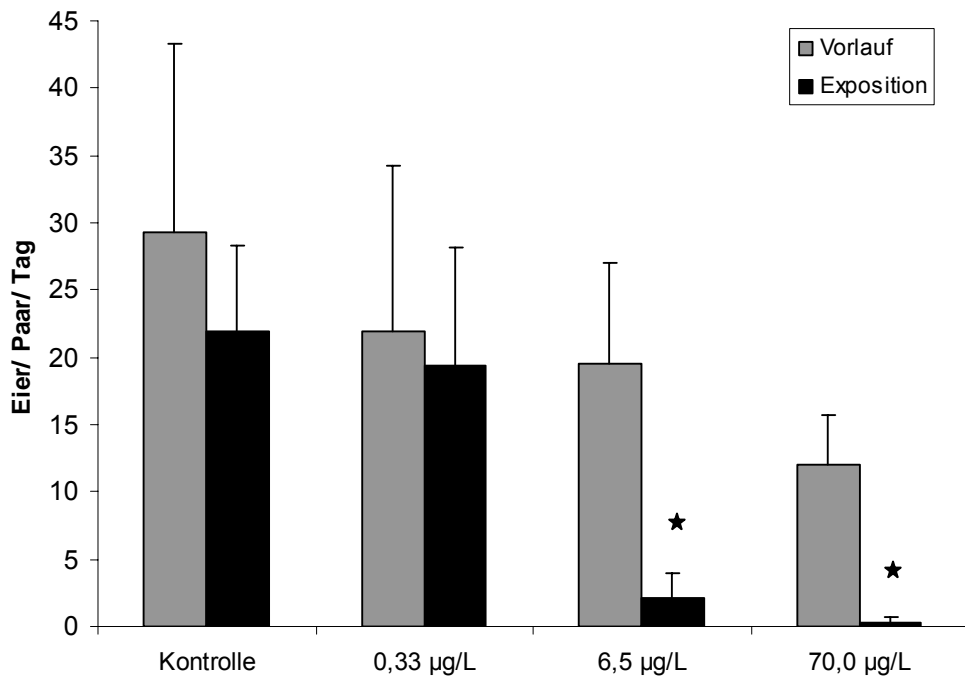


Abbildung 4.18: Reproduktive Effekte von 0,33- 70,0 µg/L Drosipirenon: Reproduktionserfolg. Links: Vorlaufphase, Rechts: Expositionsphase.  $p_{6,5} = 0,0005$ ,  $p_{70} = 0,0001$ .

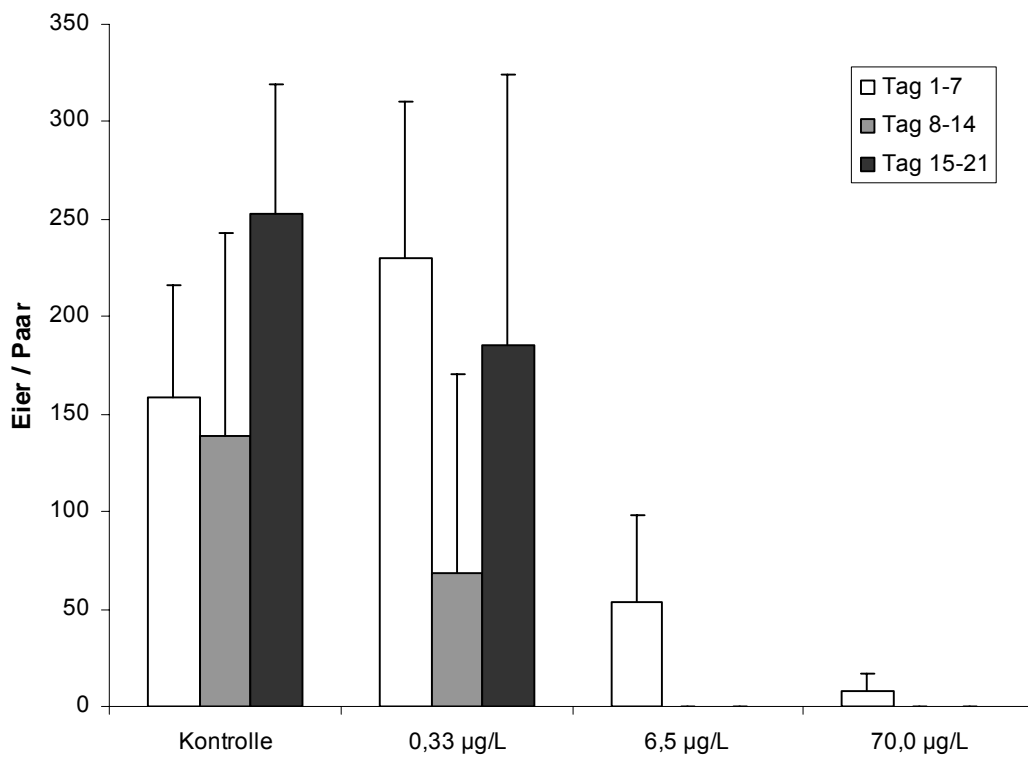


Abbildung 4.19: Reproduktive Effekte von Drosipirenon: Eier pro Paar und Woche der Expositionsphase, weiß: Tag 1-7, grau: Tag 8-14, schwarz: Tag 15-21.



#### 4.1.4.4 Gonadenhistologie Drospirenon

Die Weibchen der mittleren und hohen Konzentrationen zeigten vergrößerte Ovarien mit einem hohen Anteil degenerierender vitellogener Oocyten. Zusätzlich konnte eine hohe resorptive Aktivität (Makrophagen) und verschiedene apoptotische und nekrotische Prozesse wie die Degeneration der folliculären Wände beobachtet werden. Im Vergleich mit der Kontrolle zeigte die histomorphometrische Evaluierung einen Anstieg (49%) der degenerierenden atretischen Follikel (POAF's) und einen geringeren Anteil primärer Oocyten (8,6%) und reifer Oocyten (23,8%), (Tab. 4.5).

Die männlichen Fische zeigten eine Zunahme reifer Spermatozoen und größere Hoden (Abb. 4.20; D). Bei der höchsten Dosis erschienen die Tubuli vergrößert und deren Lumen war gefüllt mit reifen Spermatozoen. Das Keimepithel war verdickt, wodurch das interstitielle Gewebe zusammengedrückt erschien. Dieser Druck erzeugte daher eine Atrophie der interstitiellen Sertoli- und Leydig-Zellen. Die mittlere Anzahl der Spermatozoen pro Gesichtsfeld nahm von der Kontrolle zur höchsten Dosis von 95,8 auf 51 ab. Es konnte eine Verschiebung des relativen Anteils der einzelnen Stadien beobachtet werden, so nahm der Anteil der Spermatozoen von der Kontrolle zur höchsten Dosis ab (4,8%), während der Anteil der reifen Spermatozoen anstieg (16,6%). Allerdings war die Anzahl untersuchter Schnitte pro Gruppe zu niedrig, um eine statistische Auswertung zu erlauben.

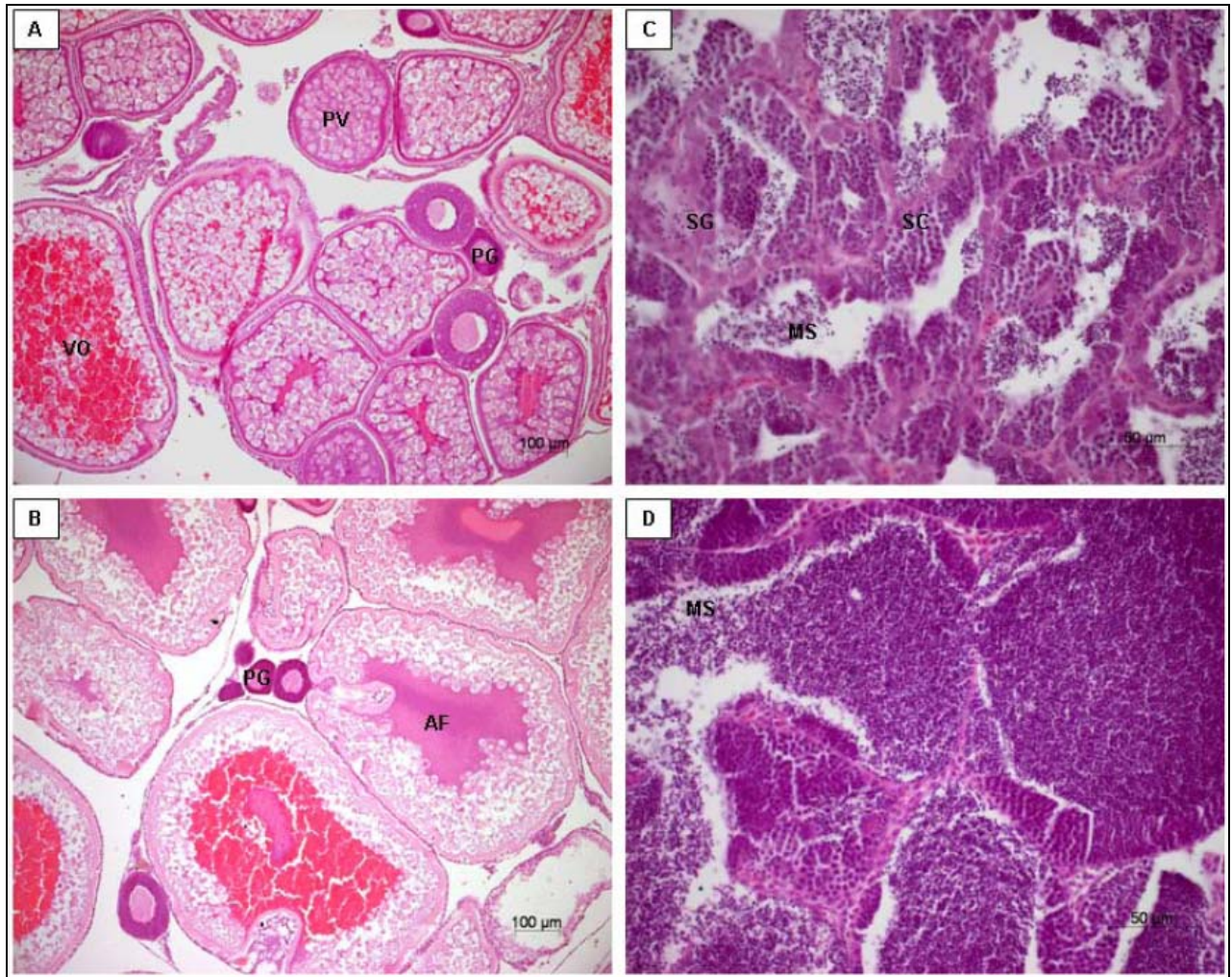


Abbildung 4.20: Histologie der Gonaden; A: Schnitt eines Kontroll-Ovars; B: nach Exposition gegenüber 70 µg/L DRSP; C: Hoden eines Kontroll-Männchens; D: Nach Exposition gegenüber 70 µg/L DRSP. PG= Primäre Oocyte, PV= Prävitellogene Oocyte, VO= Vitellogene/ reife Oocyte, AF= präovulatorischer atretischer Follikel, SG= Spermatogonien, SC= Spermatozyten, MS= reife Spermatozoen.

Tabelle 4.6: Ovarien von Weibchen der Kontrolle und der drei Konzentrationen DRSP; mittlerer Anteil der verschiedenen Reifestadien (%).

|                        | Kontrolle | 0,33 µg/L | 6,5 µg/L | 70,0 µg/L |
|------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| Primäre Oocyten        | 37,0      | 39,4      | 27,2     | 28,4      |
| Prävitellogene Oocyten | 34,2      | 28,0      | 16,6     | 17,8      |
| Vitellogene Oocyten    | 26,0      | 31,6      | 5,2      | 2,2       |
| Atretische Follikel    | 3,0       | 1,1       | 51,0     | 52,0      |

## 4.2 Bestimmung des Hormongehaltes im Fischfutter

Um zu überprüfen, ob kommerzielle Flockenfutter Phytohormone enthalten, die mögliche Substanzeffekte verfälschen können, wurde ein Transaktivierungstest für estrogene Agonisten und Antagonisten am ER durchgeführt. Die Extrakte aus den fünf getesteten kommerziell erhältlichen Fischfuttern [1.) Milkivit Pro Aqua Brut Forellenaufzuchtfutter, 2.) Sera Vipan Hauptfutter, 3.) TetraMin Hauptfutter, 4.) Tetra Pro Premiumfutter, 5.) Multifit Hauptfutter] hatten keine (ER $\alpha$ : Futter 1, 4; ER $\beta$ : Futter 1, 2, und 4) oder eine geringe Aktivität (ER $\alpha$ : Futter 2, 3, 5; ER $\beta$ : Futter 3, 5) am Estrogenrezeptor zur Folge. Die schwach wirksamen Futterextrakte erwiesen sich am ER $\alpha/\beta$  um den Faktor 100000-1000000 schlechter wirksam als die Referenzsubstanz Estradiol (E<sub>2</sub>), (Abb. 4.21).

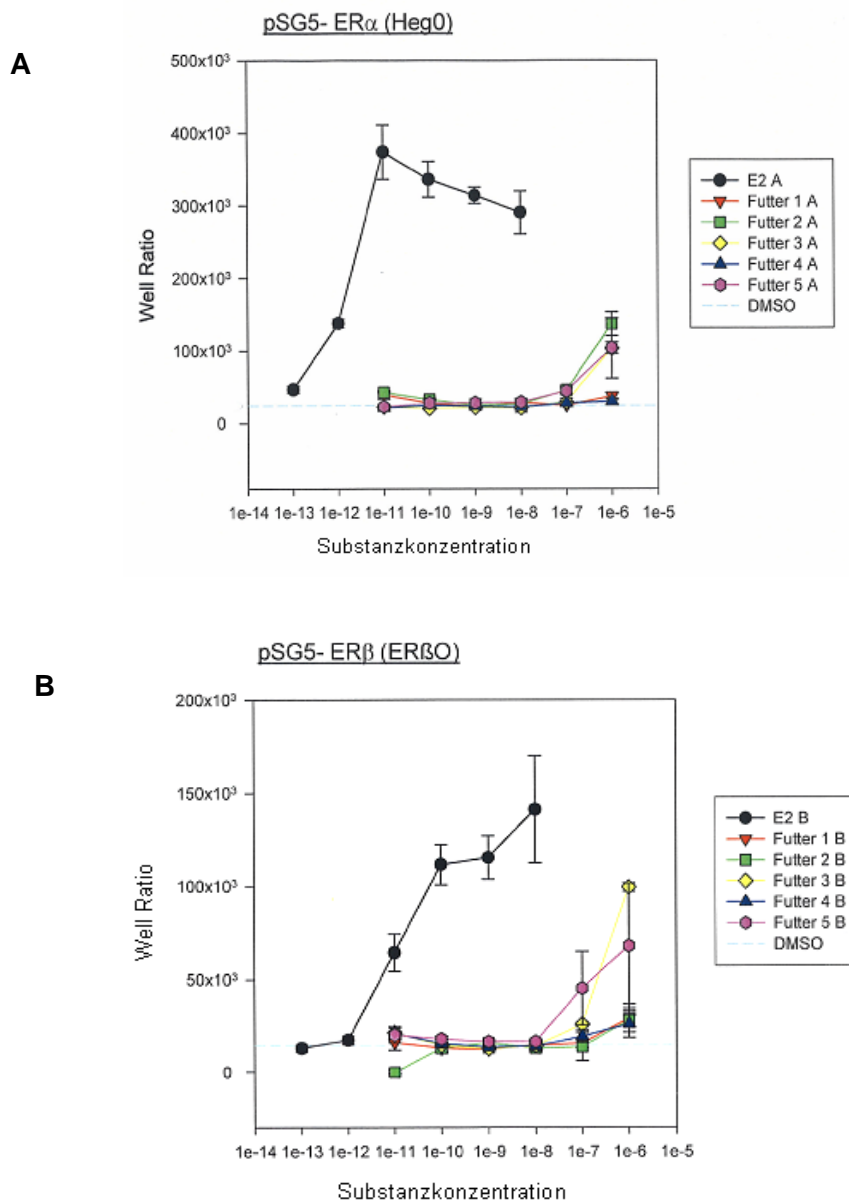


Abbildung 4.21: Dosis-Wirkungskurven der estrogenen Aktivität der getesteten Fischfutter; A: am ER $\alpha$ ; B: am ER $\beta$ .

Als estrogenfrei und damit für die Fütterung in Studien mit endokrin aktiven Substanzen geeignete Futtermittel erwiesen sich die Proben des Milkivit Forellenaufzuchtfutters und des Flockenfutters Tetra Pro. Da die Fische eine Präferenz für Flockenfutter zeigten und das Forellenaufzuchtfutter zudem eine kurze Haltbarkeit aufweist, erfolgte für alle durchgeführten Versuche die Fütterung mit TetraMin Pro (für die Jungfischzucht mit zermörsertem Futter).

### 4.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung von Vitellogenin, dem Dotterprotein aus dem Ganzkörper-Homogenat der behandelten Dickkopfritzen erfolgte mittels eines ELISA-Kits. Die Auswertung der Standardkurve ergab einen Korrelationskoeffizienten von  $R^2=0,982$ , was etwas unterhalb des im Kit angegebenen Wertes von  $R^2=0,990$  liegt. Um die Regressionsgerade zu verbessern, können Einzelwerte ausgeschlossen werden, wodurch jedoch auch Messwerte aus dem Bereich herausfallen (Abb. 4.22).

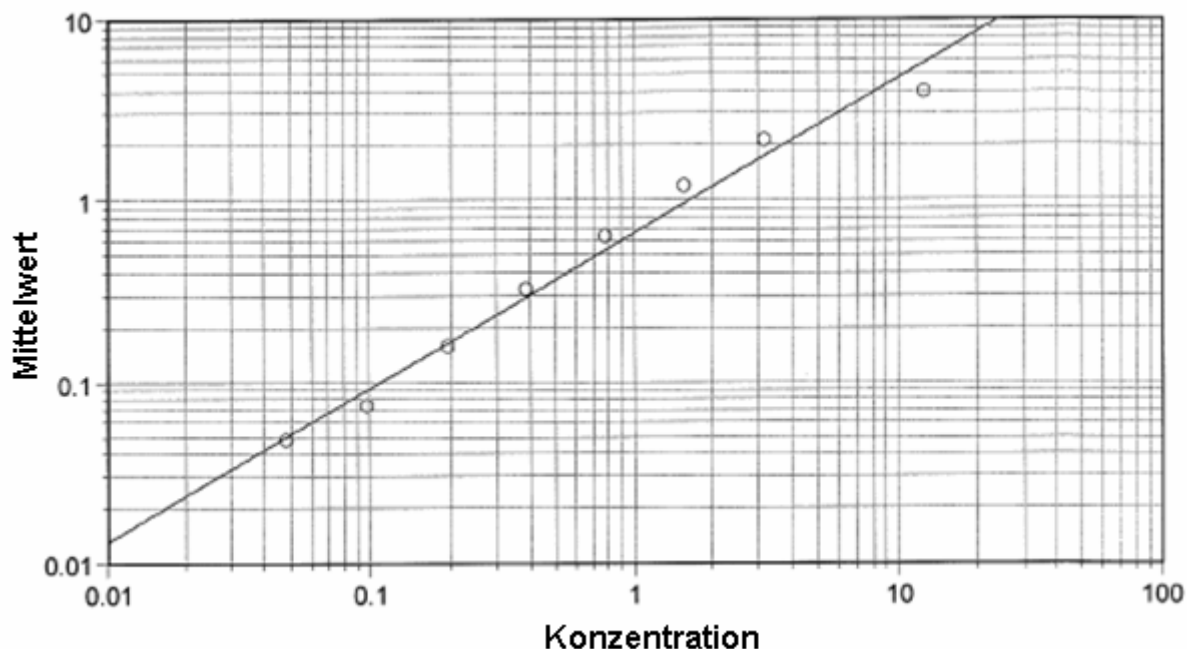


Abbildung 4.22: Standardkurve des VTG-ELISA.  $\text{Log}(y) = A + B \cdot \text{Log}(x)$ :  $A = -0,179$ ;  $B = 0,853$ ;  $R^2 = 0,982$ .

Die Messung der Ganzkörperhomogenate der Dosisfindung zum Zwei-Generationen-Test mit Levonorgestrel zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,495$ ) in den Proben der Kontrolltiere und den mit 20 ng/L behandelten Fischen (Abb. 4.23). Die gemessenen Vitellogenin-Konzentrationen lagen zwischen 0,2 und 527,0 ng/mL und der Vergleich der Mittelwerte der zwei Zeitpunkte (Kontrolle Tag 145: 154,3 ng/mL; Tag 170: 52,5 ng/mL und 20 ng/L Tag 145: 36,3 ng/mL; 20 ng/L Tag 170: 70,9 ng/mL) zeigte keine deutliche Entwicklung über die Zeit. Bei den Werten über 100 ng/mL ist davon auszugehen, dass es sich um nicht geschlechtsreife Weibchen handelte, Werte unterhalb von 10,0 ng/mL deuteten eher auf Männchen hin.

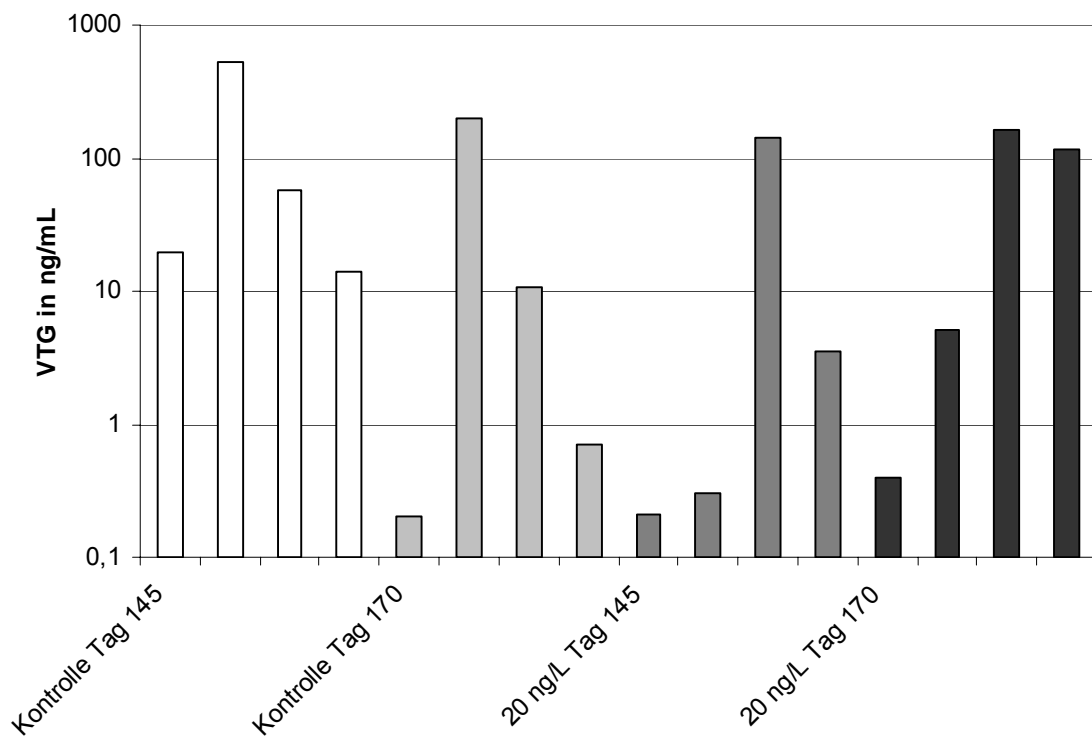


Abbildung 4.23: VTG-Konzentrationen unbehandelter und mit 20 ng/L LNG behandelter Fische (Zwei-Generationen-Test); logarithmische Darstellung.

Die Messung der Ganzkörperhomogenate der Fische aus dem Reproduktionstest mit Dienogest zeigte einen deutlichen Unterschied des Vitellogenin-Gehalts des Homogenates zwischen weiblichen und männlichen Fischen (Faktor 250-450) (Abb. 4.24). Die Mittelwerte der beiden untersuchten Fische je Kontrolle und Behandlung lassen nicht auf einen signifikanten Substanzeffekt auf den Vitellogenin-Gehalt schließen (Kontrolle M: 26,1 ng/mL; W: 6070,45 ng/mL; Behandlung M:16,8 ng/mL; W:7520,5 ng/mL).

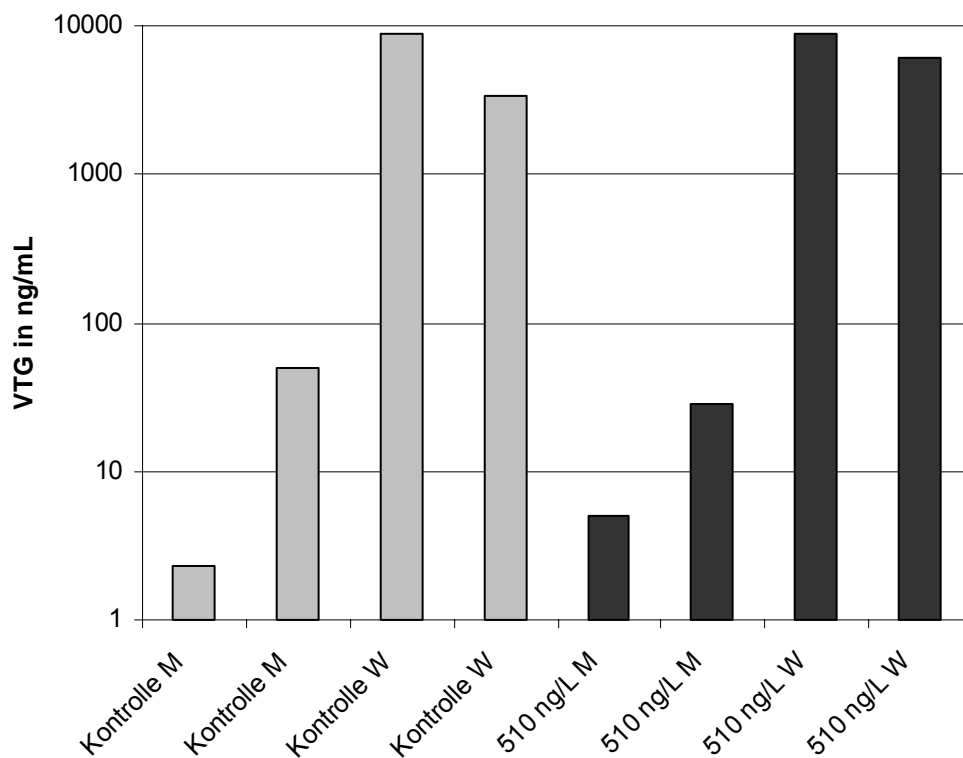


Abbildung 4.24: Vergleich der VTG-Konzentrationen unbehandelter und mit 510 ng/L DNG (gemessen) behandelter Fische; logarithmische Darstellung.

## 4.4 Immunhistochemie

Für die Etablierung des Nachweises von Zielantigenen bei der Dickkopfeleritze mit verschiedenen monoklonalen Maus-Anti-Fisch-Antikörpern (Fisch CYP1A, Karpfen-VTG, Zebrafisch-VTG) wurden die optimalen Verdünnungen, Vorbehandlungen, Proteinblocks sowie Einwirkzeiten der verschiedenen Antikörper in Vorversuchen getestet und austitriert, so dass sie gemäß ihres Zielantigens einen spezifischen Nachweis bei geringer Hintergrundfärbung lieferten. Die optimalen Bedingungen für die verschiedenen Nachweise sind im Folgenden aufgeführt:

### 1.) Monoklonaler Maus-Anti-Fisch CYP1A- Antikörper:

Für den Nachweis von Cytochrom P450 1A mit dem CYP1A-Antikörper erwies sich eine Wärmeverbehandlung mit Citratpuffer im Dampfgerar sowie ein Proteinblock mit 100%-igem Ziegen-Serum als geeignet. Von den getesteten Verdünnungen des Primärantikörpers (1:20, 1:40, 1:80) zeigte die höchste Verdünnung nach 1,5 Minuten Einwirkzeit das beste Ergebnis für Antigenmarkierung bei geringer, unspezifischer Hintergrundfärbung.

Der Antikörper markierte selektiv die Strukturen auf den Ganzkörperschnitten, in denen das Zielantigen (Cytochrom P450 1A) exprimiert war, besonders in Leber, Niere und Darmepithel (Abb. 4.25). CYP1A spielt als mitochondriales Enzym eine wichtige Rolle im Metabolismus von Fremdstoffen, es sorgt für eine Oxidation und damit bessere Wasserlöslichkeit und Ausscheidung der Schadstoffe.

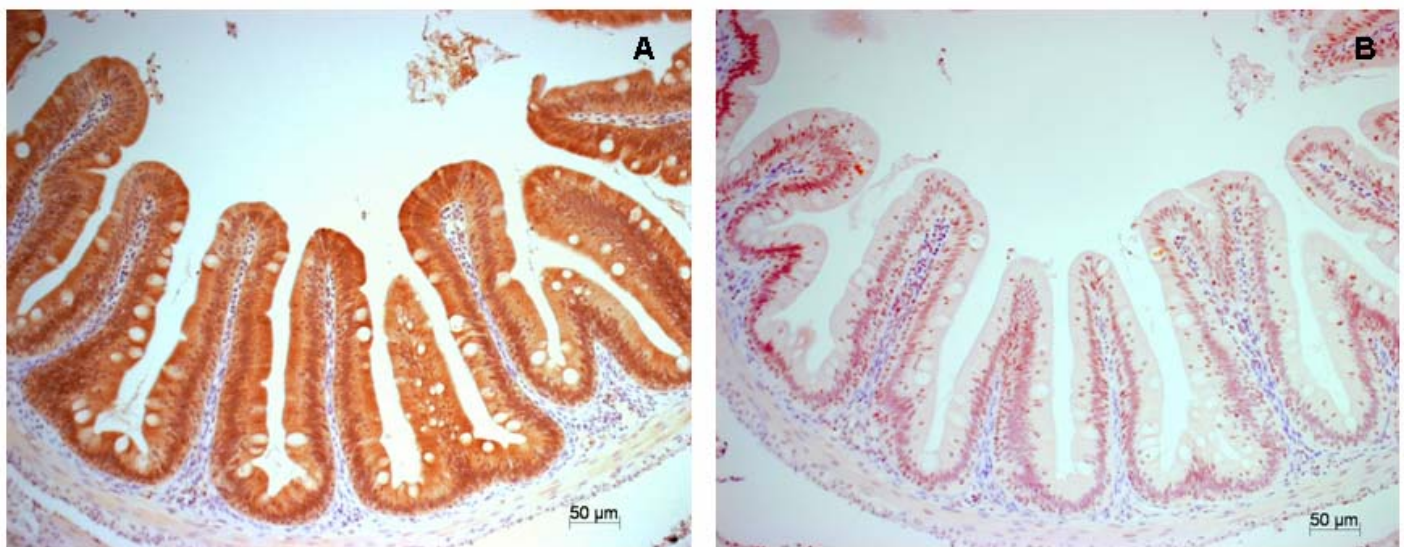


Abbildung 4.25: Immunhistochemischer Nachweis von Cytochrom P450 1A mit dem Maus-Anti-Fisch-CYP1A-AK  
A: im Darmepithel einer Dickkopfeleritze, Kontrollweibchen. B: Negativ-Kontrolle ohne Antikörper.

### 2.) Monoklonaler Maus-Anti-Karpfen-Vitellogenin- Antikörper:

Für den Nachweis von Vitellogenin mit dem Anti-Karpfen-VTG-Antikörper erwies sich eine enzymatische Vorbehandlung mit "Fast Enzyme" sowie ein UV-Proteinblock als geeignet. Von den getesteten Verdünnungen des Primärantikörpers (1:50, 1:100, 1:500) zeigte die höchste Verdünnung nach 2 Minuten Einwirkdauer das beste Ergebnis für Antigenmarkierung bei geringer, unspezifischer Hintergrundfärbung.

Der Antikörper markierte selektiv die Vitellogenin-haltigen Vesikel (Abb. 4.26, A; Detail; Abb. 4.28) in der vitellogenen Oocyte an, während die Cortical-alveolären Vesikel und die primären Oocyten (vor der Inkorporation des Dotterproteins) ungefärbt blieben. Die Negativ-Kontrolle (Abb. 4.26, B) zeigte nur eine schwache, unspezifische Hintergrundfärbung in Darm, Leber und Niere (nicht gezeigt).

### 3.) Monoklonaler Maus-Zebrafisch-Vitellogenin-Antikörper:

Für den Nachweis von Vitellogenin mit dem Anti-Zebrafisch-VTG-Antikörper erwies sich ebenfalls die enzymatische Vorbehandlung mit "Fast Enzyme" sowie ein Proteinblock mit 100%-igem Goat-Serum als geeignet. Von den getesteten Verdünnungen des Primärantikörpers (1:50, 1:100, 1:500) zeigte die höchste Verdünnung nach 1,5 Minuten Einwirkdauer das beste Ergebnis für Antigenmarkierung bei geringer, unspezifischer Hintergrundfärbung.

Der Antikörper gegen das Zebrafisch-Vitellogenin färbte auch bei der Dickkopfritze spezifisch die Vitellogenin-haltigen Vesikel an. Abbildung 4.27 (A) zeigt, dass die an der Peripherie der vitellogenen Oocyte noch kleinen Tröpfchen sich zentral ausbreiteten und vergrößerten und die gut differenzierbaren cortical-alveolären Vesikel zur Peripherie gedrängt wurden (vgl. Detail; Abb. 4.29).

Nach Vergleich der beiden Vitellogenin-Antikörper fiel auf, dass der Antikörper gegen Karpfen-Vitellogenin nur die frühesten Dottervesikel markierte, während die großen, zentralen Vesikel ebenso ungefärbt blieben wie die cortical-alveolären Vesikel und damit nicht von ihnen differenziert werden konnten (Abb. 26 und 28). Der Anti-Zebrafisch-Vitellogenin-Antikörper hingegen schien gleichermaßen selektiv an alle Vitellogenin- oder dessen Abbauprodukte enthaltenden Vesikel zu binden (Abb. 27 und 29).



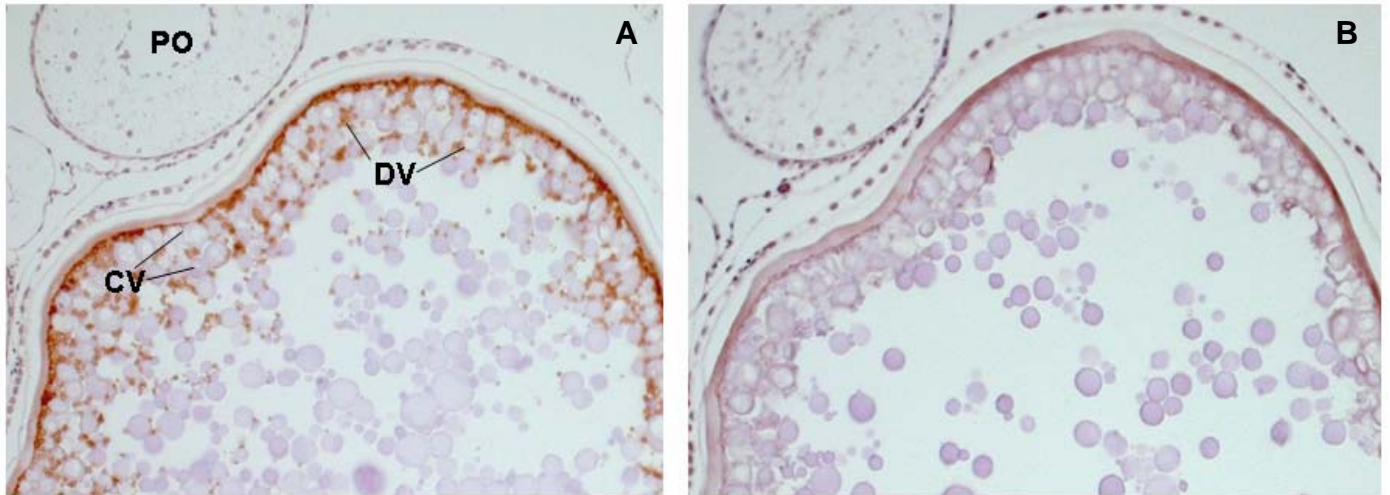


Abbildung 4.26: Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Karpfen-Vitellogenin-AK in einer vitellogenen Oocyte einer Dickkopfritze. A: Selektive Anfärbung der Dottervakuolen (DV), CV= cortical-alveoläre Vesikel, PO= primäre Oocyte, Kontrollweibchen. B: Negativkontrolle.

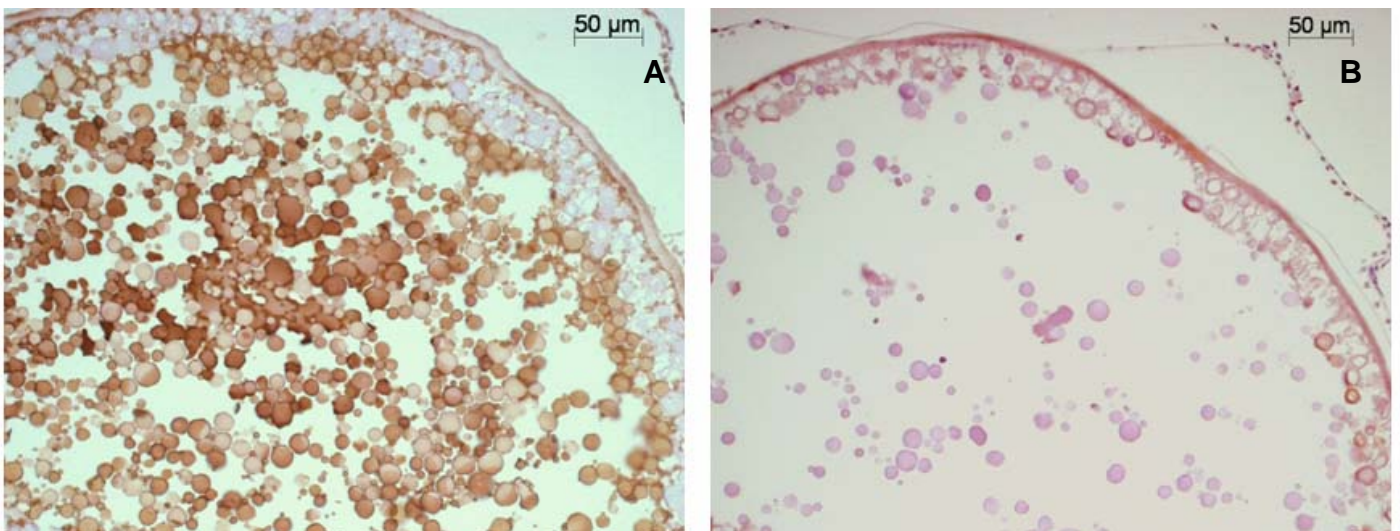


Abbildung 4.27: A: Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-Vitellogenin-AK in einer vitellogenen Oocyte einer Dickkopfritze, Kontrollweibchen. B: Negativkontrolle.

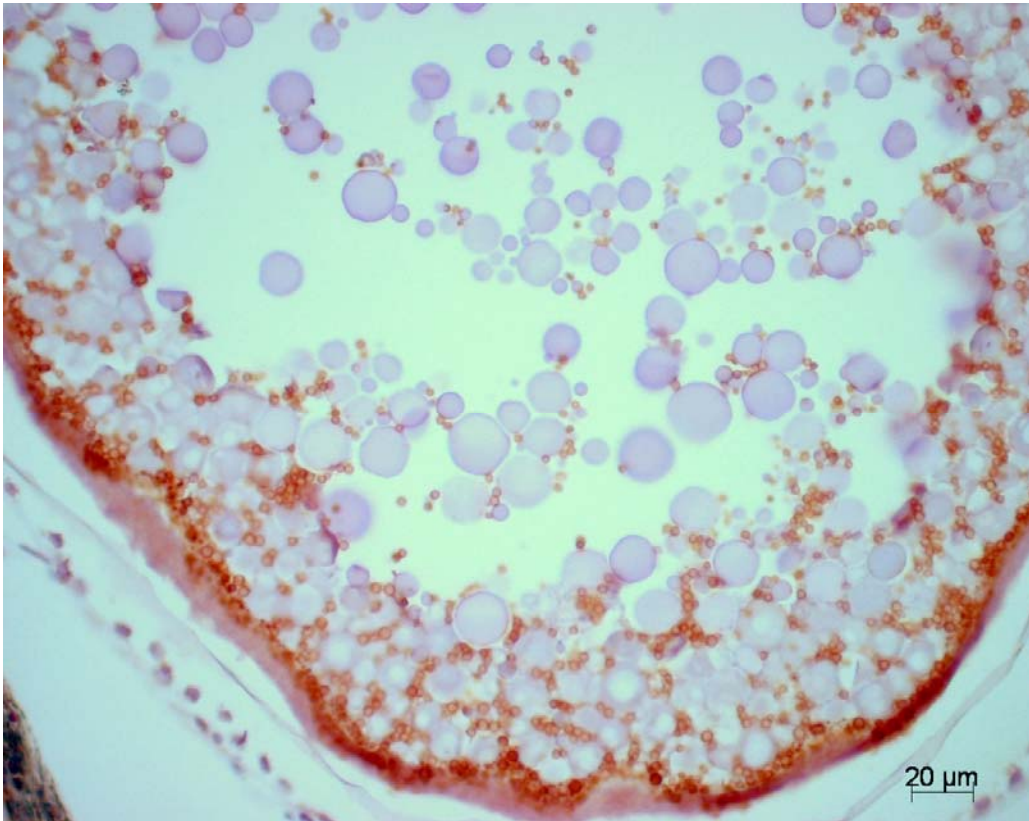


Abbildung 4.28: Detail; Immunhistochemischer Nachweis des Dotterproteins Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Karpfen- VTG-AK in einer vitellogenen Oocyte einer Dickkopfeleritze, Kontrollweibchen (Vergrößerung x 40).

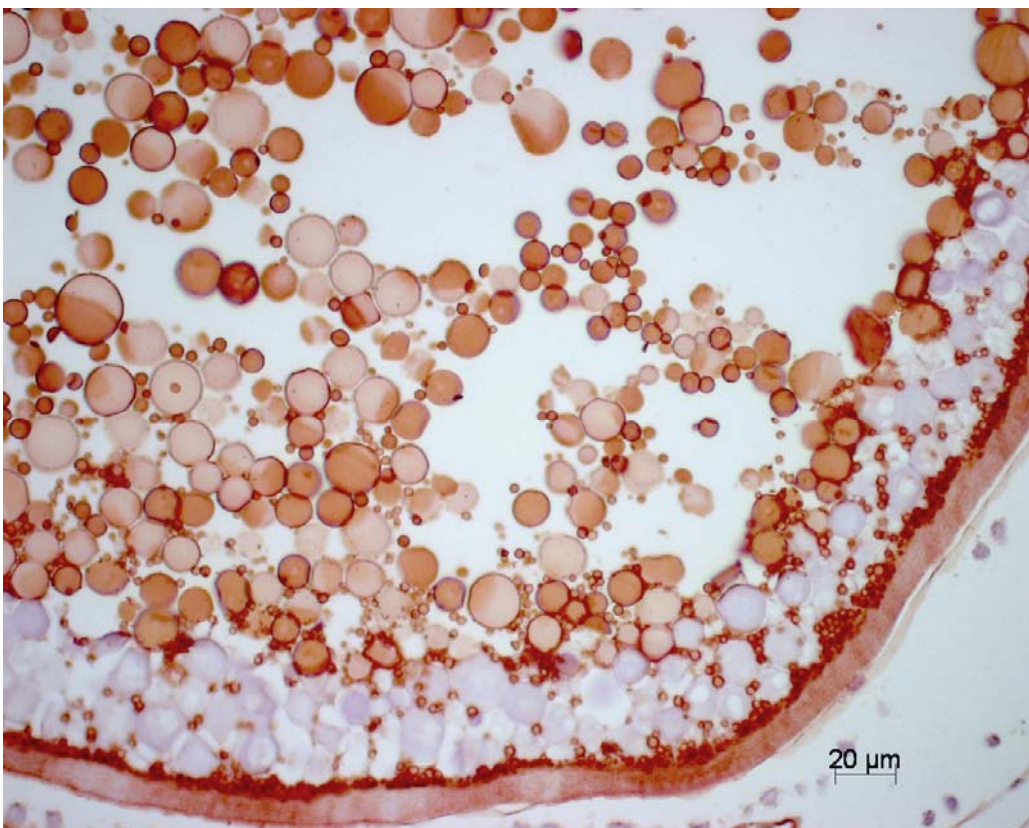


Abbildung 4.29: Detail; Immunhistochemischer Nachweis des Dotterproteins Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-VTG-AK in einer vitellogenen Oocyte einer Dickkopfeleritze, Kontrollweibchen (Vergrößerung x 40).

Ein Unterschied in der Vitellogenin-Konzentration in der Leber zwischen Kontroll- und behandelten Tieren war aufgrund von nichtimmunologischen Bindungsphänomenen mit der verwendeten Methode nicht eindeutig zu beurteilen. Da in beiden Geschlechtern bereits in der Negativkontrolle eine erhebliche unspezifische Hintergrund-Färbung zu sehen war, konnte ein Substanzeffekt von Levonorgestrel nicht eindeutig festgestellt werden (Abb. 4.30).

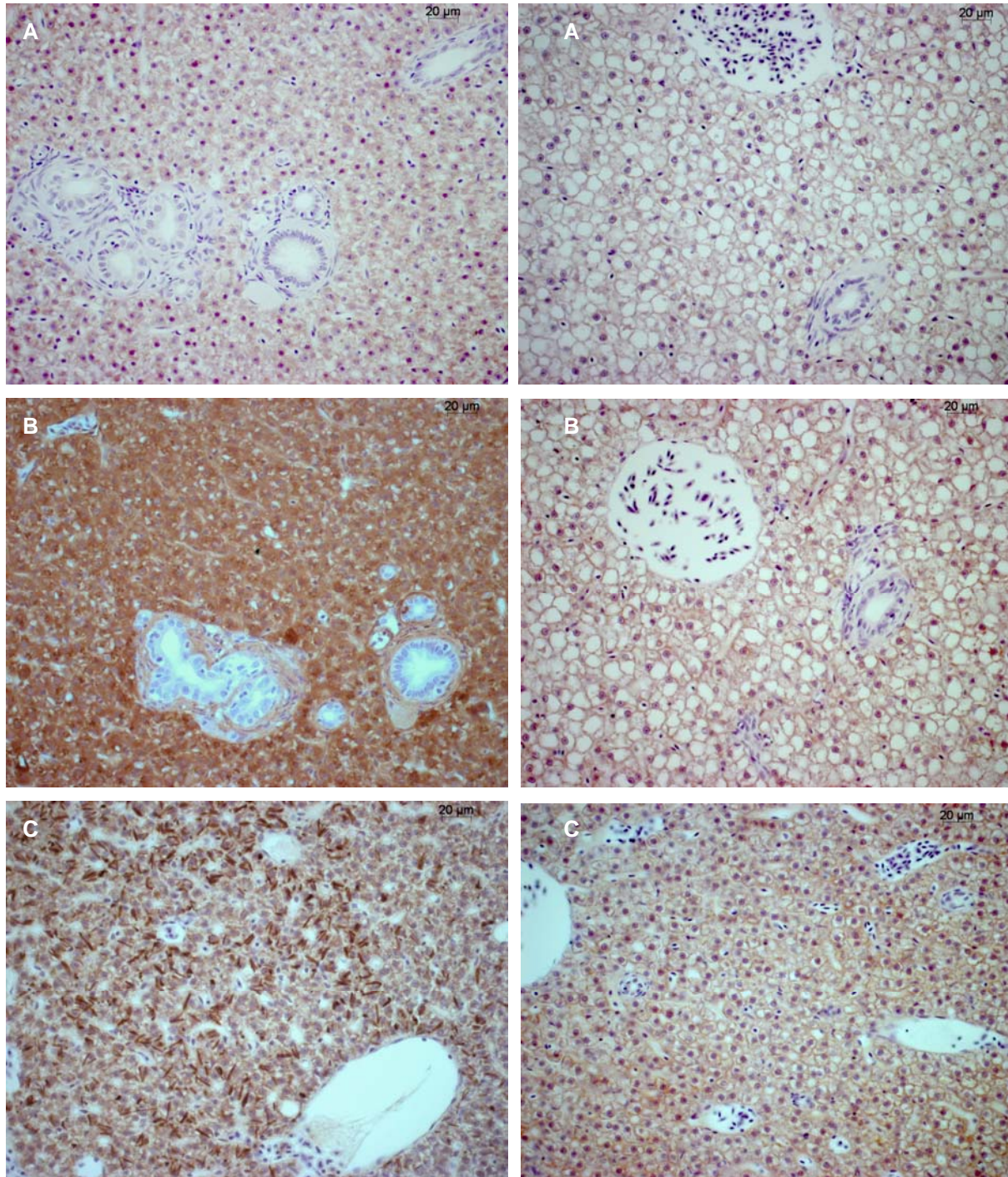


Abbildung 4.30: Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-VTG-AK in der Leber von weiblichen (links) und männlichen (rechts) Dickkopflritzen (Vergrößerung x 40). Von Oben nach unten: A: Negativkontrolle, B: Kontrolle und C: 20 ng/L Levonorgestrel.

Bei den männlichen Fischen zeigte das Hodengewebe wie erwartet keine positive Reaktion mit dem verwendeten Vitellogenin-Antikörper (Abb. 4.31).

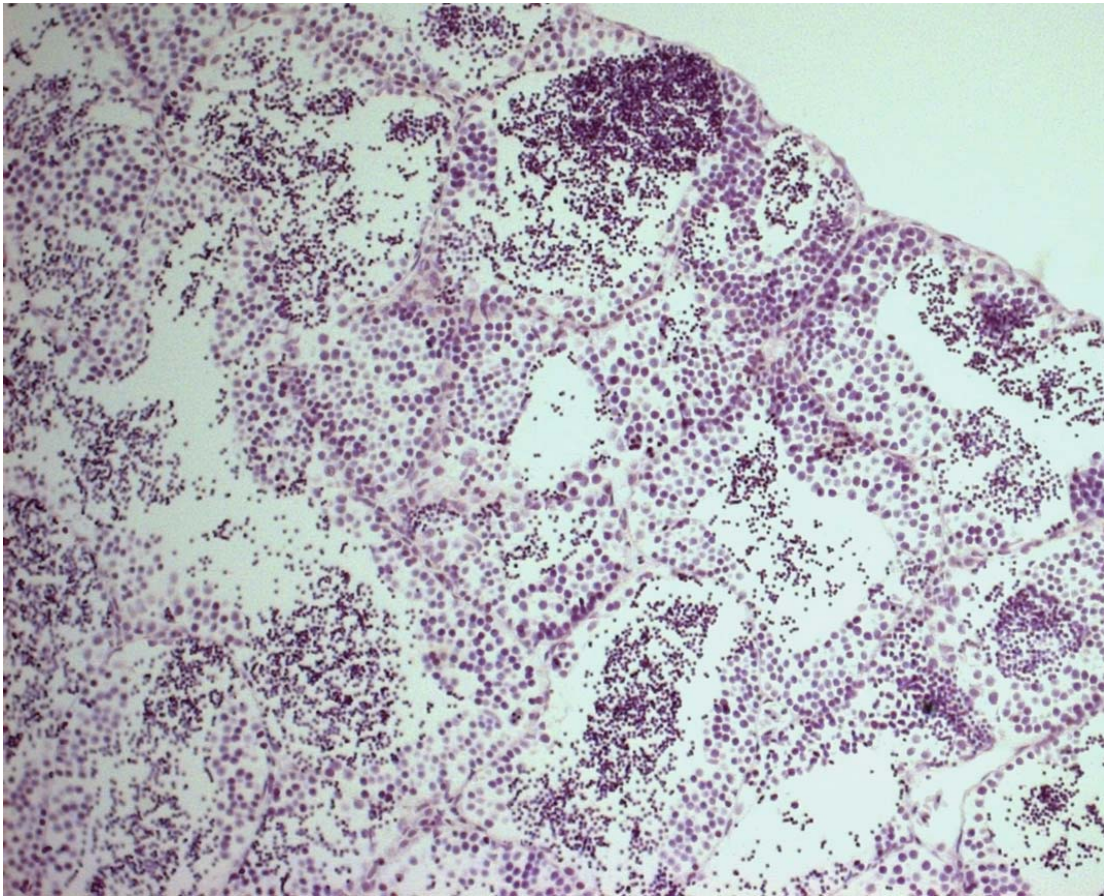


Abbildung 4.31 Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-VTG-AK in Hoden von männlichen Dickkopfelritzen, 20 ng/L LNG (Vergrößerung x 40); keine positive Reaktion.

Deutlich konnten hingegen die atretischen Follikel bei den mit 20 ng/L Levonorgestrel behandelten Weibchen dargestellt werden. Der Antikörper hatte die Auflösung des Ooplasmas mit dem degenerierenden Dottermaterial spezifisch markiert (Abb. 4.32).

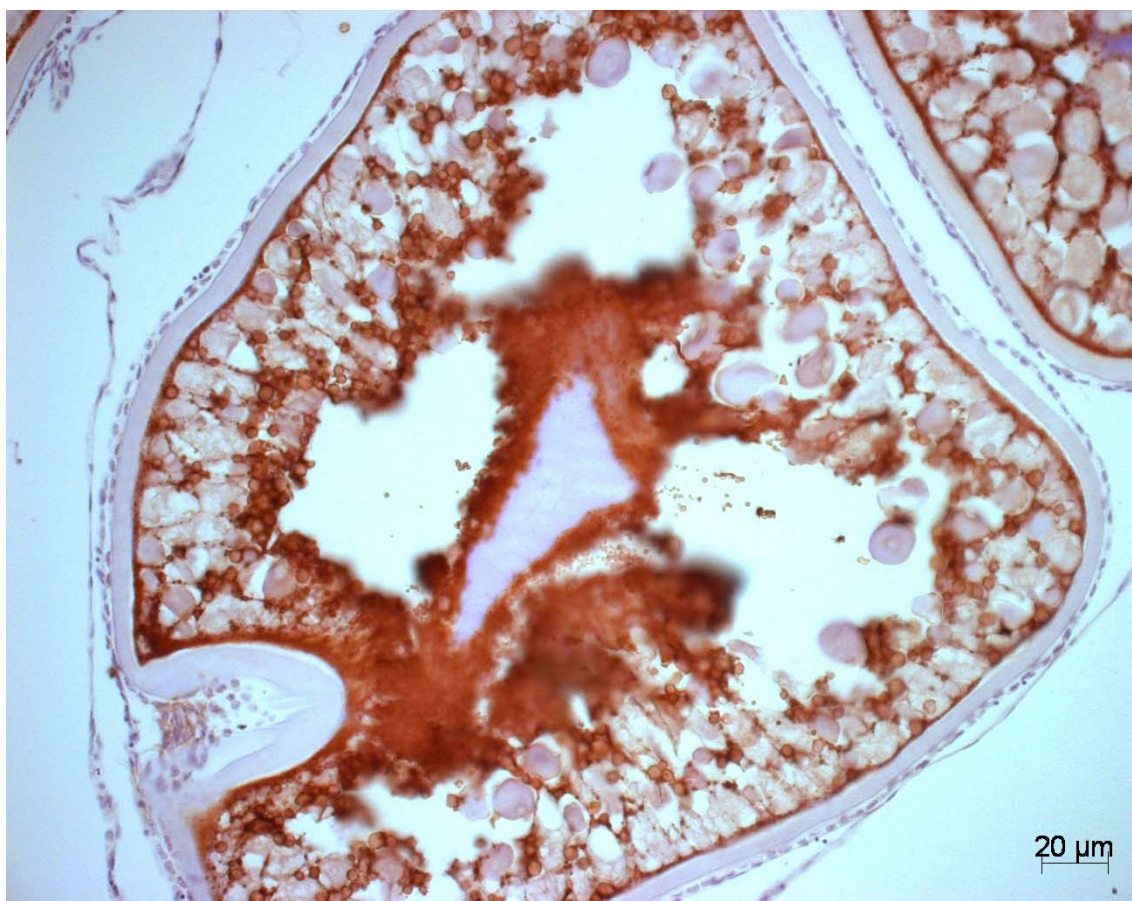


Abbildung 4.32: Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-VTG-AK in atretischem Follikel einer weiblichen Dickkopfelritze, 20 ng/L LNG (Vergrößerung x 40).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Gehaltsanalytik**

Die Analytik der Testlösungen zeigte bei allen verwendeten Progestinen große Unterschiede zwischen den nominalen und gemessenen Konzentrationen und ergab eine mittlere Wiederfindung zwischen 30 und 50%. Die Ursache für die schlechte Wiederfindung der Progestine ist wahrscheinlich in der Adsorption der lipophilen Steroide an den Oberflächen (Schläuche, Spritzen, Glas) des Durchfluss-Systems zu suchen wie es auch schon für Ethinylestradiol beobachtet wurde [27]. Es kann trotz des permanenten Durchflusses von Frischwasser von einer Sättigung der Oberflächen ausgegangen werden, da meist gegen Ende der Expositionszeit höhere Wiederfindungen zu verzeichnen waren. Aufgrund des Testdesigns ist aber eine verlängerte Sättigungsphase nicht möglich, da die Fische über den gesamten Versuchszeitraum in einem Aquarium verbleiben. Eine übermäßige Störung durch mehrmaliges Umsetzen sollte vermieden werden, da sich Störungen negativ auf die Reproduktion auswirken könnten. Da aber alle Stammlösungen sowohl direkt nach dem Ansetzen als auch am Ende der Exposition eine zufriedenstellende Wiederfindung zeigten und der Durchfluss sowie der Vortrieb der Spritzen regelmäßig überprüft wurden und eine Proportionalität zur Nominalkonzentration gewährleistet war, kann ein Dosierungsfehler ausgeschlossen werden. Auch ein Fehler der Analysenmethode kann ausgeschlossen werden, da die Messung der dotierten Proben stets eine gute Wiederfindung (>90%) ergab.

### **5.2 Reproduktions- und Entwicklungseffekte**

Um die Effekte von drei derzeit vermarkteten Progestinen auf die aquatische Umwelt zu untersuchen, wurden verschiedene 21-Tage Reproduktionstests und mit einer Substanz (Levonorgestrel) ein Zwei-Generationen-Test (mit Dosisfindungsstudie) am Fisch durchgeführt.

Die Reproduktionstests mit Levonorgestrel ergaben im Vergleich zur Leitungswasserkontrolle in allen Behandlungsgruppen einen signifikant verringerten Reproduktionserfolg. Aufgrund der vergleichsweise hohen Variabilität in der Anzahl der gelegten Eier und der für die chemische Analyse sehr geringen Konzentrationen war es nicht möglich, eine sichere No-Observed-Effect-Concentration (NOEC) zu bestimmen. Schon ab 0,8 ng/L wurde eine Störung beobachtet. Die Effekte auf die Fertilität in der mittleren und hohen Konzentration spiegelten sich auch auf der Gewebeebene in histologischen Veränderungen der Ovarien und Hoden wieder.

Dienogest bewirkte ab einer gemessenen Konzentration von 293 ng/L aufwärts eine verringerte Anzahl der Eier pro Gelege und einen Rückgang der Anzahl abgelegter Eier in der höchsten Dosis, wobei dieses nicht statistisch signifikant war. Die niedrigste Dosis von 65 ng/L (gemessen) zeigte keinen Effekt, so dass bei dieser Konzentration die NOEC festgelegt werden konnte.

Die Behandlung mit Drospirenon sorgte erst im µg-Bereich (Nominalkonzentration 20,0 µg/L; gemessen 6,5 µg/L) für einen Stillstand der Reproduktion der Fische mit einer klaren Dosis-Wirkungsbeziehung und einem NOEC von 2,0 µg/L (nominal). Da diese Nominalkonzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze lag, kann sie aufgrund der mittleren Wiederfindung von 33% in den beiden höheren Dosierungen mit 0,66 µg/L abgeschätzt werden. Die Effekte auf die Fertilität in der mittleren und hohen Konzentration wurden auch durch histologische Veränderungen der Gonaden deutlich.

Außer den beschriebenen Effekten auf den Reproduktionserfolg zeigten die mit Levonorgestrel behandelten Weibchen eine De-novo-Synthese von Nuptialtuberkeln bei einer Konzentration von 100 ng/L (nominal) sowohl im Reproduktionstest als auch in der Life-Cycle-Exposition (ab 50/22 ng/L, nominal/gemessen). Diese Nuptialtuberkel sind ein morphologisches Geschlechtsmerkmal für reproduktiv aktive männliche Dickkopfritzen und unterliegen der androgenen Regulation durch 11-KT [66]. Die Exposition gegenüber Androgenen kann beim Fisch in einer Maskulinisierung resultieren; die Metaboliten des wachstumsfördernden androgenen Hormons Trenbolonacetat aus der Rinderzucht (17α- und 17β-Trenbolon) sorgten ab 11 ng/L (17α-) bzw. 27 ng/L (17β-Trenbolon) für eine starke Maskulinisierung der weiblichen Fische mit der Neubildung von Nuptialtuberkeln [4;67]. Daher kann aufgrund des Auftretens der Tuberkel bei den mit Levonorgestrel behandelten Weibchen vermutet werden, dass hierfür der androgene Partialeffekt des Progestins verantwortlich ist. Die Wirkschwelle liegt dabei im 21-Tage Reproduktionstest noch bei nominalen 100 ng/L, während sich dieser Effekt in der chronischen Exposition mit Levonorgestrel im gleichen Konzentrationsbereich (22 ng/L) wie mit 17β-Trenbolon einstellte.

Die Bindungsaffinität des Nortestosteron-Derivates Levonorgestrel am AR ist beim Menschen mit 58% der Affinität des natürlichen Liganden am Androgenrezeptor beschrieben [68]. Drospirenon und Dienogest zeigen eine eher antiandrogene Aktivität (Dienogest 50% und Drospirenon 33% von Cyproteronacetat, dem potentesten antiandrogenen Progestin) durch die Blockade des Androgenrezeptors gegenüber der Bindung seiner Liganden [16;49;68]. Daher trat wie erwartet keine Maskulinisierung der weiblichen Fische unter der Behandlung mit Drospirenon oder Dienogest auf.

Die Fruchtbarkeit der Fische in den Vorlaufphasen der Reproduktionstests (LNG 14,7/ DNG 10,5/ DRSP 20,7 Eier/ Tag) schien im Vergleich mit einer biologisch normalen

Reproduktionsrate von 50-200 Eiern alle 3-4 Tage (14,6–58,3 Eier/Tag; [4;69]) eher niedrig zu sein, lag aber im Rahmen der empfohlenen Qualitätskriterien der OECD Richtlinie (10-20 Eier/Reproduktionstag) [56]. Wegen der normalerweise hohen biologischen Variabilität in der Reproduktion von permanenten Laichern wäre ein experimentelles Design mit mehr Replikaten wünschenswert und würde statistisch sichere Ergebnisse liefern.

Die lebenslange Exposition gegenüber Levonorgestrel zeigte, dass die empfindlichsten Phasen beim Fisch nicht in der Embryonalentwicklung lagen (keine signifikanten substanzspezifischen Effekte auf die Zeit bis zum Schlupf/ den Schlupf/ die Überlebensrate der Larven), sondern erst während der weiteren Entwicklung auftraten. Wie auch schon bei den Reproduktionstests kam hier in erster Linie der androgene Partialeffekt von Levonorgestrel zum Tragen, so dass sich das Geschlechterverhältnis ab einer gemessenen Konzentration von 22,0 ng/L aufwärts deutlich zu mehr männlichen Tieren (>90%) hin verschob und histologisch alle Fische männliche sekundäre Geschlechtsmerkmale zeigten. Nur jeweils ein Tier der mittleren und höchsten Dosis hatte Gonaden mit Oocyten, die jedoch von Hodengewebe umgeben waren (Testes-Ova). Hierbei zeigten sich unterschiedliche Stadien der Vermännlichung: während bei einem Tier noch ein voll entwickeltes Ovar mit sich entwickelnden Hoden umgeben war, fand sich bei einem Tier ein voll entwickelter Hoden, in den vereinzelte prävitellogene Oocyten eingebettet waren. Die Tiere der höheren Behandlungsgruppen, die unentwickelte Hoden zeigten, könnten als ehemalige Weibchen gedeutet werden.

Eine vergleichbare maskulinisierende Wirkung auf das Geschlechterverhältnis konnte auch beim Medaka (*Oryzias latipes*) nach der Life-Cycle-Exposition gegenüber 27,8 ng/L Methyltestosteron beobachtet werden, während das Verhältnis durch 3,3 ng/L Methyltestosteron nicht beeinflusst wurde [70]. Da auch schon die niedrigste getestete Konzentration im Zwei-Generationen-Test mit Levonorgestrel das Geschlechterverhältnis zu beeinflussen schien (17♂ : 9♀), muss angenommen werden, dass die androgene Wirkung von Levonorgestrel bei längerer Dauer der Exposition schon bei niedrigeren Konzentrationen eintritt und diese Wirkung in der Stärke mit rein androgenen Hormonen (17β-Trenbolon, Methyltestosteron) vergleichbar ist.

Der Konditionsfaktor CF zeigte am Tag 30/56 für die Gruppe 3 (22 ng/L) eine Erhöhung und am Expositionsende (Tag 160) einen signifikanten Anstieg in den Behandlungsgruppen 22,0 und 29,7 ng/L. Da am Tag 160 in diesen Gruppen (morphologisch und histologisch) bis auf je eine Ausnahme nur Männchen zu beobachten waren, ergab sich ein höherer Faktor aus Länge und Gewicht, da Männchen im Verhältnis grundsätzlich größer und schwerer sind. Über die Geschlechterverteilung am Tag 56 ließ sich keine Aussage machen, so dass der hohe CF in Gruppe 3 in Anbetracht des normalen Wertes der Gruppe 4 als Ausreißer angesehen werden musste. Da der Effekt der Vermännlichung in der 21-tägigen



Expositionsphase des Reproduktionstests erst bei 100 ng/L auftrat, könnte die lipophile Testsubstanz durch die chronische Exposition im Fisch akkumulieren und so zu einem Anstieg des Wirkspiegels über die Zeit geführt haben.

Die ersten Anzeichen für das Vorhandensein von geschlechtsreifen Individuen (dunkle Pigmentierung der Männchen, Verhalten) waren in allen Gruppen bereits am Tag 83 nach Schlupf zu verzeichnen, was am Tag 118 zu ersten Gelegen in Gruppe 1 und 2 führte. In den Gruppen 3 und 4 konnte zu keiner Zeit ein Reproduktionserfolg beobachtet werden. Daher kann über die Dauer bis zum Einsetzen der Geschlechtsreife keine Aussage getroffen werden.

Die Verpaarung von acht Fischen je Konzentration führte außer in der Kontrolle nur in der niedrigsten Konzentration zu einem Bruterfolg. In der Gruppe 2 waren jedoch nur in zwei der vier Gruppen und dann auch nur seltene, kleine Gelege zu beobachten (2,2 Eier/Tag). Histologisch waren bei drei der vier Weibchen degenerative Veränderungen am Ovar zu beobachten. Das deutet darauf hin, dass hier die Wirkschwelle für den reproduktionshemmenden Effekt lag. Dies zeigte sich auch in einer signifikant verringerten mittleren Schlupfrate der Nachkommen der Gruppe 2 (0,7 ng/L; 38,3%) gegenüber der Kontrolle (90%) und einer stark erhöhten Mortalität der behandelten Larven. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Fitness der Elterntiere durch die Behandlung herabgesetzt war, und deren Gelege so von schlechterer Qualität waren. Eine veränderte Vitellogenin-Produktion beim Weibchen kann eine Beeinträchtigung der Nachkommen verursacht haben, da das Dotterprotein 80-90% des Eigewichtes ausmacht und den Großteil der Nährstoffe für den sich entwickelnden Embryo bereitstellt [71].

Die Fische der mittleren und hohen Konzentrationen zeigten fast ausschließlich männliche sekundäre Geschlechtsmerkmale und hatten in keinem der je vier Replikate Bruterfolg. Histologisch hatten diese Tiere bis auf je eine Ausnahme männliche Gonaden, was trotz einem weiblichen Phänotyp den mangelnden Bruterfolg erklärt. Bei den einzigen Tieren mit weiblichen Gonaden in der mittleren und höchsten Konzentration konnte neben den Ovarien gut entwickeltes Hodengewebe mit deutlich differenzierbaren Spermatogonien, Spermatozyten und reifen Spermatozoen sowie Samenleitern beobachtet werden, was auf eine aktive Spermatogenese hindeutet [70]. Dies stellte eine klare Maskulinisierung der Gonaden zusätzlich zu den sekundären Geschlechtsmerkmalen dar. Für die morphologische und histologische Vermännlichung wurde die wirksame Dosis im Zwei-Generationen-Test daraufhin bei 22 ng/L festgelegt, was deutlich unterhalb des LOAEL ("lowest observed adverse effect Level") für die morphologische Vermännlichung im 21-Tage Reproduktionstest mit 100 ng/L (nominal) liegt. Daraus lässt sich schließen, dass eine lebenslange Exposition mit Levonorgestrel die Wirkschwelle gegenüber dem kürzeren Reproduktionstests herabsetzt.

Aussagen über eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu treffen, war aufgrund der schlechten Wiederfindung der Substanz schwierig, da die mittlere und die höchste Konzentration so nah beieinander lagen. Substanzspezifische Effekte auf Wachstum und Entwicklung waren bis zur Geschlechtsentwicklung nicht zu beobachten. Deutlich wurde jedoch, dass das LOAEL von Levonorgestrel für eine Maskulinisierung der sekundären Geschlechtsmerkmale in der Zwei-Generationen-Exposition bei 22 ng/L lag (NOEC bei 0,7 ng/L), während für die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses (histologisch) keine NOEC gefunden werden konnte.

### 5.3 Vitellogeninbestimmung mittels ELISA und Immunhistochemie

Der Vitellogeningehalt der Fische aus einem Reproduktionstest mit Dienogest und der Dosisfindung zum Zwei-Generationen-Test mit Levonorgestrel wurde mittels eines ELISA-Kits bestimmt. Die Bestimmung der Vitellogenin-Konzentrationen in den Ganzkörperhomogenaten der im Reproduktionstest mit Dienogest behandelten Fische zeigte, dass sich die Werte der männlichen und weiblichen Tiere deutlich unterschieden, und so eine Geschlechtszuordnung über diesen Parameter möglich war. Dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und den behandelten Tieren ergab, kann allerdings auch auf die Verwendung der Ganzkörperhomogenate zurückzuführen sein, da hier nicht der Wirkspiegel des Proteins im Blut bestimmt wird, sondern in allen Kompartimenten des Körpers. Somit wäre eine verminderte Vitellogenin-Produktion in der Leber möglicherweise überlagert von der großen Anzahl reifer und degenerierender vitellogener Oocyten aus dem Ovar bei den behandelten Weibchen. Ganzkörperhomogenate von adulten Fischen sind also nicht geeignet, einen Effekt der gestesteten Substanz sensitiv zu erfassen.

Verglichen mit verschiedenen Literaturdaten, in denen die Größenordnung des Vitellogeningehaltes je nach Technik (Ganzkörperhomogenat oder Plasma) auch mit dem gleichen Testverfahren um ein bis zwei Größenordnungen schwankt, scheinen die gemessenen Werte mit 6,07- 7,5 µg/mL bei den Weibchen eher gering zu sein, während sie bei den Männchen mit 0,0017- 0,0026 µg/mL gut mit den Literaturdaten übereinstimmen. WILLIAMS ET AL. (2007) [46] fanden im Plasma von adulten Kontrollfischen (Dickkopfelritzen) zwischen 6415 und 12900 µg/mL bei Weibchen und 1,6-3,4 µg/mL bei Männchen, während HARRIES ET AL. (2000) [72] in Ganzkörperhomogenaten von Kontroll-Weibchen zwischen 107 und 345 µg/mL und bei Kontroll-Männchen 0,0023-0,0029 µg/mL fanden.

Die in der Dosisfindung zum Zwei-Generationen-Test gegenüber Levonorgestrel exponierten Tiere zeigten Werte zwischen 0,2 und 527 ng/mL. Diese müssten am Tag 145 nach Schlupf

bereits deutlich höhere Vitellogenin-Werte aufweisen und auch größere Unterschiede in den Werten, die sich dann dem Geschlecht zuordnen lassen (Männchen:  $<0,1 \mu\text{g/mL}$ , Weibchen:  $>100\mu\text{g/mL}$ ; [73]. Auch war kein signifikanter Anstieg zwischen Tag 145 und 170 zu beobachten, sowie zwischen den Kontroll- und den behandelten Tieren. Zwischen Tag 63 und 114 sollte bereits ein deutlicher Anstieg ( $\times 1000$ ) des Vitellogenin-Spiegels bei den Weibchen zu beobachten sein [73].

Die niedrigen Messwerte lassen sich zum einen durch eine enzymatische und physikalische Degradation durch das mehrmalige Einfrieren und Auftauen erklären [74], und zum anderen durch eine Bindung an die verschiedenen endogene Proteine im Ganzkörperhomogenat, die durch das Zentrifugieren abgetrennt wurden und damit nicht mehr erfasst werden konnten. Des Weiteren ist aber auch kürzlich eine ausgeprägte Intra-Assay-Variabilität für Karpfen-, Dickkopfelritzen- und Zebrafisch-Vitellogenin festgestellt worden [74]. Eine bessere Wiederfindung des Proteins sollte bei einer Bestimmung aus dem Plasma erzielt werden können.

Mit der verwendeten Nachweismethode konnte demnach kein Substanzeffekt der beiden Progestine Levonorgestrel und Dienogest auf den Vitellogeningehalt gezeigt werden. Vitellogenin ist vielfach als sensitiver Biomarker für Stoffe mit estrogen/antiestrogen/androgen Wirkung beschrieben worden [4;27;33;42;75] und kann durch diese Stoffe induziert oder unterdrückt werden. Eine Wirkung von Gestagenen auf den Vitellogenin-Spiegel wurde bisher nicht berichtet. Im Reproduktionstest mit Dienogest zeigte sich keine andere als die gestagene Wirkung, so dass die Substanz den Vitellogenin-Gehalt nicht unbedingt beeinträchtigen muss. Für Levonorgestrel, bei dem sowohl im Reproduktionstest als auch im Zwei-Generationen-Test die androgene Partialwirkung im Vordergrund stand, wäre ein herabgesetzter Vitellogenin-Spiegel bei den Weibchen zu erwarten gewesen. Da aber kein Unterschied zur Kontrolle gezeigt werden konnte, können die niedrigen Messwerte nicht auf einen Substanzeffekt zurückgeführt werden.

Die Anwendung der immunhistochemischen Methoden konnte das Dotterprotein Vitellogenin qualitativ in den Zielgeweben nachweisen. Hierbei zeigte sich, dass es Unterschiede in der Affinität der beiden getesteten Antikörper gegenüber dem Vitellogenin und dessen Abkömmlingen Lipovitellin und Phosvitin gab. Während der monoklonale Anti-Karpfen-Vitellogenin-Antikörper aus der Maus selektiv an die frisch endocytotisch aufgenommenen Dottervesikel gebunden wurde und die wachsenden, zentralen Vesikel ungebunden blieben, markierte der monoklonale Anti-Zebrafisch-Vitellogenin-Antikörper alle Dottervesikel gleichermaßen selektiv. Eine ebenso selektive Bindung des entsprechenden Antikörpers an das Vitellogenin und dessen Abbauprodukte konnte auch für Regenbogenforellen gezeigt

werden [76]. Die Interspezies-Kreuzreaktivität für Vitellogenin-Antikörper bei Fischen ist gering, da nur wenige Genregionen übereinstimmende Sequenzen aufweisen, meist in der Lipovitellin-1 Domäne, die für die Vitellogenin-Rezeptorbindung verantwortlich ist [74]. Im Gegensatz dazu besteht innerhalb der Familie der Karpfenartigen eine ausgeprägte Kreuzreaktivität unter den Spezies [42;74], so dass die verwendeten Antikörper für Karpfen und Zebrafisch eine ausreichende Bindung mit dem Vitellogenin der Dickkopfeleritze aufweisen müssten. MYLCHREEST ET AL. [33] stellten allerdings im ELISA eine erhöhte Kreuzreaktivität des Karpfen-Vitellogenin-Antikörpers mit anderen Proteinen und daraus resultierend eine geringe Spezifität des Antikörpers gegenüber dem Vitellogenin der Dickkopfeleritze fest.

Der Nachweis des Dotterproteins in der Leber bei männlichen und weiblichen Dickkopfeleritzen ist mit keinem der beiden Vitellogenin-Antikörper zufriedenstellend gelungen, da die Negativkontrolle in allen Fällen bereits eine deutliche Hintergrundfärbung zeigte. Diese unspezifische Färbung kann auf eine Interaktion des Avidin-Peroxidase-Komplexes mit dem endogenen Biotin in der Leber (auch in Darm, Niere, lymphatisches Gewebe) zurückzuführen sein [77;78]. Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin und bildet trotz Auftragen des Avidin-Biotin-Blocks einen Enzym-Komplex und führt so zu falsch-positiven Reaktionen. Um die Reaktion mit dem endogenen Biotin zu umgehen, müsste ein Biotin-freier Nachweis wie z.B. die Polymermethode angewendet werden [79].

Die Anwendung immunhistochemischer Methoden zum Nachweis von Vitellogenin schien geeignet zu sein, um das Zielprotein an seinem Produktions- bzw. Wirkort qualitativ darzustellen. Um einen quantitativen Nachweis zu ermöglichen, müssen erst die verschiedenen Störfaktoren wie die nichtimmunologische Proteinbindung und die Hintergrundfärbung methodisch sicher ausgeschlossen werden.

### **5.4 Mechanismus der Toxizität**

Literaturdaten zeigen, dass beim Karpfen, wie auch in den meisten anderen Teleostern,  $17\beta$ -Estradiol der Mediator des Oocytenwachstums ist, während das Progesteron  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-Progesteron die Reifung ("maturation-inducing hormone", MIH) über die Stimulation des Keimbläschen-Unterganges (GVBD) induziert, welcher Teil der präovulatorischen Reifungsprozesses ist [43]. Ähnlich der endokrinen Regulation im Säuger involviert die Ausschüttung der stimulierenden Gonadotropine von der Hypophyse eine komplexe Interaktion von internen und externen Stimuli, welche durch chemische Kontaminationen der aquatischen Umwelt gestört sein können [17]. Eine Störung der

beschriebenen physiologischen Prozesse kann beim Fisch auch in einer morphologischen Veränderung der Gonaden resultieren.

Als Resultat der Exposition gegenüber den drei getesteten Progestinen war bei den exponierten Weibchen ein zum Teil massiver Anstieg atretischer Follikel zu beobachten. Follikelatresie ist charakterisiert durch die Destabilisierung der Eihülle und die Degeneration der Zellkerns und des Dottermaterials. Solche präovulatorischen atretischen Follikel (POAF's) werden meist von einwandernden Makrophagen phagozytiert und resorbiert [80]. Bei den Kontroll-Weibchen war je nach Zeitpunkt vor/nach dem Ablachen das komplette Spektrum der Stadien einschließlich sich entwickelnder und reifer Oocyten vorhanden. Der Anteil atretischer Follikel bei den Kontroll-Weibchen der Reproduktionstests war gering (0-3,5%). In Abhängigkeit von der Phase im Laichzyklus kann die relative Anwesenheit der verschiedenen Reifestadien variieren [81]. Bei permanent laichbereiten Spezies wird ein Anteil an atretischen Follikeln bis zu 12% als ein normaler Prozess während langer Laichperioden angesehen [57].

Eine Atresie der Follikel kann außerdem durch Umweltstress [34] oder durch das Fehlen eines Laichsubstrates ausgelöst werden. Vor dem Beginn der Eiablage müssen die Männchen der Fettkopfbrassen eine Laichhöhle besetzen und so das Weibchen zur Eiablage stimulieren. Aus diesem Grund könnte die während der Exposition beobachtete Aggressivität der Männchen und das mangelnde Interesse an der Laichhöhle für das fehlende Brutverhalten verantwortlich sein. Das Auftreten einer massiven Follikelatresie ist auch im Zusammenhang mit hohen Dosen des synthetischen Estrogens  $17\beta$ -Estradiol (E2) durch Hemmung der Vitellogenese aufgrund von blockierter Gonadotropinproduktion (negativer Feedback) beschrieben [82]. Dieser negative Feedback könnte in der Hypophyse zu einer Hemmung der Ausschüttung von Gonadotropin-II führen, welches den Mediator der Ovulation darstellt (vergleichbar mit dem luteinisierenden Hormon LH beim Säuger) [34]. In diesem Zusammenhang erscheint die Messung des Plasma-Vitellogenin-Spiegels sinnvoll.

Für das Androgen  $17\alpha$ -Methyltestosteron ist ein ähnlicher negativer Feedback beschrieben: in niedrigen Konzentrationen (10-100  $\mu\text{g/L}$ ) treten ein vergrößerter Bauchumfang durch eine vergrößerte Anzahl reifer Oocyten und eine gehemmte Ovulation auf, bei höheren Konzentrationen (>100  $\mu\text{g/L}$ ) kommt es zu interstitiellen Ödemen in Folge einer Überexpression von Vitellogenin nach Interaktion des Androgens mit dem Estrogenrezeptor, so dass nur vitale previtellogene Oocyten vorhanden sind [82].

In den Hoden der mit den drei Progestinen behandelten Männchen wiesen die Veränderungen auf einen proliferierenden Effekt mit einer Verzögerung der Spermiation hin, allerdings in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen.

Wie bei YARON (1995) und NAGAHAMA (1994) beschrieben [18;38], wechselt der steroidogene Pathway bei männlichen Teleostern zu Beginn der Spermiation vom Androgen zu  $17\alpha,20\beta$ -DP, was für die finale Reifung und die Motilität der Spermien essentiell ist. Die Produktion von  $17\alpha,20\beta$ -DP in den Spermien bedarf der Stimulation durch ein Vorläuferhormon ( $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron) über Gonadotropine der Hypophysen-Gonaden-Achse.

$17\alpha,20\beta$ -DP wird auch für das Erlangen der Motilität der Spermien über eine Erhöhung des pH-Wertes der Spermidukte benötigt. Das äußerlich verabreichte Progestin kann offenbar den beschriebenen hormonellen Wechsel in deutlich höherem Maße verursachen, woraus eine ansteigende Anzahl reifer Spermien und eine verstärkte Ausprägung des Keimepithels resultieren könnte. Obwohl die Spermienmotilität keiner der untersuchten Endpunkte der Studien war, deuteten die histologischen Befunde der Hodengewebe der exponierten Männchen auf eine verschlechterte Beweglichkeit der reifen Spermien hin, da diese nicht entlassen wurden und die Männchen kaum Brutverhalten zeigten. Das könnte auf einen negativen Feedback mit fehlendem Gonadotropin-II Signal zurückzuführen sein, ähnlich wie bei den Weibchen diskutiert. Unter dem Einfluss eines Überschusses von Progesteron würde die Spermienreifung weiter voranschreiten, aber die Spermien würden unbeweglich bleiben und das Einsetzen der Spermiation würde durch das fehlende Gonadotropin-II Signal unterbleiben.

### 5.5 Vergleich der drei Progestine und Umweltrelevanz der Befunde

Im Vergleich der Substanzen scheint Drospirenon tausendfach weniger potent hinsichtlich einer reproduktionstoxischen Wirkung beim Fisch zu sein als Levonorgestrel und hundertfach geringer als Dienogest. Die Unterschiede der drei Substanzen in ihrer oralen Bioverfügbarkeit (DNG 96,2%, DRSP 76% [68], LNG 100% [83]) und der Lipophilie (Log  $P_{ow}$  n-Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient; LNG: 3,55; DNG: 1,6; DRSP: 3,08) sind gering. Ein Log  $P_{ow}$  von  $\geq 1$  spricht dafür, dass diese Substanzen lipophil sind. Des Weiteren beschreiben ELGER ET AL. (2003) [14], dass die relative Bindungsaffinität von Levonorgestrel zum humanen uterinen Progesteronrezeptor höher als die von Drospirenon (verglichen mit Promegeston: Progesteron 30%, DRSP 20%, LNG 250%) und Dienogest (verglichen mit Promegeston, 5%) ist [84]. Daher wurde auch eine unterschiedliche Effektivität in der Inhibition der Ovulation bei der Ratte ( $ED_{50}$ : LNG 0,01-0,03 mg; DRSP 0,3-1,0 mg/Tier s.c.) [51] oder beim Menschen (DNG 1,0 mg/Tag p.o.) [84] gefunden.

Die Aufnahme von Steroiden in den Fischkiemen ist vermittelt über ein Geschlechtshormon-bindendes Globulin im Plasma ("plasma sex steroid binding globulin", SHBG), welches in der

Leber produziert wird. Beim Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass SHBG eine hohe Affinität zu diversen natürlichen und synthetischen Steroiden hat, mit einer Präferenz für Testosteron und Estradiol. Auch beim Menschen/Säuger ist die Bindung an das SHBG zum Teil verantwortlich für die Pharmakokinetik von Progestinen [68]; es wurde gezeigt, dass Levonorgestrel mit hoher Affinität unter Bildung eines stabilen Komplexes gebunden wird, aus dem es nur langsam dissoziiert [85], während Dienogest zu 90% an das Serumalbumin bindet und keine SHBG-Bindung vorliegt [84]. In den Fällen von  $17\alpha$ -Ethinylestradiol und Levonorgestrel überschreitet die Affinität der synthetischen Steroide die der natürlichen Liganden: die relative Bindungsaffinität des Zebrafisch-SHBG für Levonorgestrel ist beschrieben als 52% der von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT), während die Affinität für 11-Ketotestosteron, dem aktiven Androgen im Zebrafisch, geringer ist (28%) [86]. Daher ist der Transport von Levonorgestrel vergleichbar oder sogar besser als der androgener Steroide, was die hohe Sensitivität der Dickkopfritze gegenüber dem androgenen Partialeffekt von Levonorgestrel erklären würde.

Die Umweltrelevanz der ermittelten Daten ließ sich mit Hilfe der Berechnung des Verhältnisses der "predicted environmental concentration" (PEC) zur "predicted no-effect concentration" (PNEC) nach der Formel abschätzen, die in dem EMEA-Leitfaden zur Umweltrisikobewertung von Humanarzneimitteln festgelegt ist [87]. Für die Berechnung der PEC wird danach die maximale Tagesdosis mit dem Marktdurchdringungsfaktor  $F_{pen}$  multipliziert und durch den Wasserverbrauch multipliziert mit der Verdünnung im Oberflächengewässer geteilt. Die PNEC wird unter Verwendung der experimentell ermittelten NOEC  $\times 0,1$  (Sicherheitsfaktor) berechnet. Das PEC/PNEC-Verhältnis gibt dann Aufschluss über eine potentielle Gefährdung durch die Substanz. Dabei gilt ein Verhältnis von  $<1$  als unbedenklich, während bei einem Wert von  $\geq 1$  ein mögliches Risiko besteht. In einer vom schwedischen pharmazeutischen Herstellerverband initiierten Risikobewertung für alle Wirkstoffgruppen wurde anhand von schwedischen Marktdaten das Umwelt-Gefährdungspotential dieser Stoffe ermittelt [www.fass.se]. Dabei ergab sich im Vergleich zu Ethinylestradiol (PEC/PNEC= 5.8) für die drei Progestine Levonorgestrel, Dienogest und Drospirenon ein sehr geringes Gefährdungspotential (PEC/PNEC= 0,00119/ 0,000004/ 0,00081). Für Medroxyprogesteron, das bisher einzige mit bis zu 15 ng/L in Gewässern nachgewiesene Progestin war aufgrund von fehlenden In-vivo-Daten keine Abschätzung der Gefährdung möglich, dessen Verkaufsmenge lag in Schweden aber sehr deutlich über denen der anderen drei Progestine (Medroxyprogesteron 117,5 kg/Jahr; Levonorgestrel 7,8 kg/Jahr; Dienogest 0,4 kg/Jahr und Drospirenon 29,3 kg/Jahr). Allerdings bezogen sich die Daten, die zur Berechnung der PNEC herangezogen wurden, auf Ergebnisse aus Algen- und Wasserflohtests sowie auf akute Fischtoxizitätstests, in denen lediglich die letale Dosis ( $LD_{50}$ ) bestimmt wurde. Eine Berechnung anhand der in dieser Arbeit ermittelten chronischen

und sub-chronischen Daten zur Reproduktionstoxizität ergab ein anderes Bild: für Levonorgestrel, für das keine NOEC festgelegt werden konnte, wurde die PNEC anhand der LOEC/2 berechnet, was ein PEC/PNEC-Verhältnis von 4,75 ergab. Für Dienogest und Drospirenon ergaben sich anhand der sub-chronischen NOEC-Daten ebenso kritischere Werte für das PEC/PNEC-Verhältnis (0,009 / 0,7). Daraus wurde deutlich, wie wichtig die Daten zur subchronischen Toxizität sind, um ein Umweltrisiko abzuschätzen, speziell bei endokrin aktiven Stoffen wie den synthetischen Gestagenen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Studien zeigen, dass die drei Progestine einen vergleichbaren inhibierenden Effekt auf die reproduktive Funktion bei der Dickkopfelritze verursachten, allerdings in deutlich unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Für Drospirenon konnte eine NOEC bei einer nominalen Konzentration 2 µg/L (0,66 µg/L) festgelegt werden. Dieser Wert ist deutlich oberhalb der vorhergesagten Umweltkonzentrationen, die bei 45 ng/L angesiedelt sind. Die Daten für Dienogest zeigten auch keine unmittelbare Gefährdung an, da die NOEC bei 65 ng/L und somit ebenfalls über der PEC von 0,06 ng/L liegt. Für Levonorgestrel konnte auf Grund seiner androgenen Partialwirkung keine NOEC festgelegt werden. Basierend auf einer theoretischen Abschätzung (übereinstimmend mit [87]), können die Umweltkonzentrationen von Levonorgestrel in Europa ein Level von 2 ng/L erreichen. Daraus folgt, dass durch Levonorgestrel verursachte Effekte auf die Reproduktion von Fischen durchaus von ökotoxikologischer und populationsdynamischer Relevanz sein können.



## 6 Literaturverzeichnis

1. G. Van Der Kraak, T. Zacharewski, D. Janz, B. Sanders and J. Gooch. Comparative Endocrinology and mechanisms of endocrine modulation in fish and wildlife. R.J.Kendall, R. L. Dickerson W. A. Suk and J. P. Giesy. Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife, 97-119. 1998. SETAC Press, Pensacola FL.
2. K. Fent and W. Meier, Effects of triphenyltin on fish early life stages, *Arch. Environ. Contam Toxicol.* **27**, pp. 224-231 (1994).
3. K. Fent, A. A. Weston and D. Caminada, Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.* **76**, pp. 122-159 (2006).
4. G. T. Ankley, K. M. Jensen, E. A. Makynen, M. D. Kahl, J. J. Korte, M. W. Hornung, T. R. Henry, J. S. Denny, R. L. Leino, V. S. Wilson, M. C. Cardon, P. C. Hartig and L. E. Gray, Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow, *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, pp. 1350-1360 (2003).
5. T. Colborn, F. S. vom Saal and A. M. Soto, Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.* **101**, pp. 378-384 (1993).
6. T. Colborn, Pesticides--how research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects on wildlife, *Environ. Health Perspect.* **103 Suppl 6**, pp. 81-85 (1995).
7. L. J. Guillette, Jr., Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife, *Growth Horm. IGF. Res.* **10 Suppl B**, p. S45-S50 (2000).
8. L. G. Parks, C. S. Lambright, E. F. Orlando, L. J. Guillette, Jr., G. T. Ankley and L. E. Gray, Jr., Masculinization of female mosquitofish in Kraft mill effluent-contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity, *Toxicol. Sci.* **62**, pp. 257-267 (2001).
9. L. J. Guillette, Jr. and M. P. Gunderson, Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants, *Reproduction* **122**, pp. 857-864 (2001).
10. R. Lange, T. H. Hutchinson, C. P. Croudace, F. Siegmund, H. Schweinfurth, P. Hampe, G. H. Panter and J. P. Sumpter, Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, pp. 1216-1227 (2001).
11. G. T. Ankley and R. D. Johnson, Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals, *ILAR. J.* **45**, pp. 469-483 (2004).
12. J. P. Sumpter, Feminized responses in fish to environmental estrogens, *Toxicol. Lett.* **82-83**, pp. 737-742 (1995).
13. J. P. Sumpter and S. Jobling, Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, *Environ. Health Perspect.* **103 Suppl 7**, pp. 173-178 (1995).

14. W. Elger, S. Beier, K. Pollow, R. Garfield, S. Q. Shi and A. Hillisch, Conception and pharmacodynamic profile of drospirenone, *Steroids* **68**, pp. 891-905 (2003).
15. R. Sitruk-Ware, Pharmacological profile of progestins, *Maturitas* **47**, pp. 277-283 (2004).
16. U. Fuhrmann, R. Krattenmacher, E. P. Slater and K. H. Fritzemeier, The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: Biochemical profile and antiandrogenic potential, *Contraception* **54**, pp. 243-251 (1996).
17. D. E. Kime, A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction, *Sci. Total Environm.* **225**, pp. 3-11 (1999).
18. Y. Nagahama, Endocrine regulation of gametogenesis in fish, *Int. J. Dev. Biol* **38**, pp. 217-229 (1994).
19. E. P. Kolodziej, J. L. Gray and D. L. Sedlak, Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent, *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, pp. 2622-2629 (2003).
20. E. P. Kolodziej, T. Harter and D. L. Sedlak, Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment, *Environ. Sci. Technol.* **38**, pp. 6377-6384 (2004).
21. Purdom CE, Hardimann PA, V. Bye, Eno NC, Tyler CR and Sumpter JP, Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works., *Chem. Ecol* pp. 275-285 (1994).
22. R. van Aerle, T. M. Nolan, S. Jobling, L. B. Christiansen, J. P. Sumpter and C. R. Tyler, Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters, *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, pp. 2841-2847 (2001).
23. S. Jobling, S. Coey, J. G. Whitmore, D. E. Kime, K. J. Van Look, B. G. McAllister, N. Beresford, A. C. Henshaw, G. Brighty, C. R. Tyler and J. P. Sumpter, Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility, *Biol. Reprod.* **67**, pp. 515-524 (2002).
24. S. Jobling, N. Beresford, M. Nolan, T. Rodgers-Gray, G. C. Brighty, J. P. Sumpter and C. R. Tyler, Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents, *Biol. Reprod.* **66**, pp. 272-281 (2002).
25. G. T. Ankley and D. L. Villeneuve, The fathead minnow in aquatic toxicology: Past, present and future, *Aquat. Toxicol.* **78**, pp. 91-102 (2006).
26. OECD, Guideline for Testing of Chemicals 210; Fish, Early-life Stage Toxicity Test, *OECD* (1992).
27. G. H. Panter, T. H. Hutchinson, R. Lange, C. M. Lye, J. P. Sumpter, M. Zerulla and C. R. Tyler, Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-) estrogenic substances, *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, pp. 319-326 (2002).
28. H. Holbech, K. Kinnberg, G. I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren and P. Bjerregaard, Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT), *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **144**, pp. 57-66 (2006).

29. E. A. Makynen, M. D. Kahl, K. M. Jensen, J. E. Tietge, K. L. Wells, K. G. Van Der and G. T. Ankley, Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Aquat. Toxicol.* **48**, pp. 461-475 (2000).
30. G. Ankley, K. Jensen, M. Kahl, J. Korte and E. Makynen, Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, pp. 1276-1290 (2001).
31. K. M. Jensen, J. J. Korte, M. D. Kahl, M. S. Pasha and G. T. Ankley, Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **128**, pp. 127-141 (2001).
32. G. T. Ankley, M. D. Kahl, K. M. Jensen, M. W. Hornung, J. J. Korte, E. A. Makynen and R. L. Leino, Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Toxicol. Sci.* **67**, pp. 121-130 (2002).
33. E. Mylchreest, S. Snajdr, J. J. Korte and G. T. Ankley, Comparison of ELISAs for detecting vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **134**, pp. 251-257 (2003).
34. C. R. Tyler and J. P. Sumpter, Oocyte growth and development in teleosts, *Reviews in Fish Biol. Fish.* **6**, pp. 287-318 (1996).
35. A. Arukwe and A. Goksoyr, Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption, *Comp. Hepatol.* **2**, p. 4 (2003).
36. K. Selman and Wallace RA, Cellular aspects of oocyte growth in teleosts., *Zoolog. Sci.* pp. 211-231 (1989).
37. C. Mylonas, L. Woods and Y. Zohar, Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass., *J.f Fish Biol.* pp. 34-49 (1997).
38. Z. Yaron, Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp, *Aquaculture* **129**, pp. 49-73 (1995).
39. WHO Geneva, International Programme on chemical Safety. Global Assessment of the State-of-the-Science of endocrine disruptors., *Environm. Health Persp.* (2002).
40. C. R. Tyler, S. Jobling and J. P. Sumpter, Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence, *Crit. Rev. Toxicol.* **28**, pp. 319-361 (1998).
41. J. P. Sumpter, Reproductive effects from oestrogen activity in polluted water, *Arch. Toxicol. Suppl* **20**, pp. 143-150 (1998).
42. C.R. Tyler, B. van der Erden, S. Jobling, G. Panter and J. Sumpter, Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to estrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish., *J. Comp. Physiol. B: Biochem. Syst. Environm. Physiol.* pp. 418-426 (1996).
43. Y. Nagahama and M. Yamashita, Regulation of oocyte maturation in fish, *Dev. Growth Differ.* **50 Suppl 1**, p. S195-S219 (2008).

44. Y. Nagahama, T. Miura and T. Kobayashi, The onset of spermatogenesis in fish, *Ciba Found. Symp.* **182**, pp. 255-267 (1994).
45. J. F. Ericson, R. Laenge and D. E. Sullivan, Comment on "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance", *Environ. Sci. Technol.* **36**, pp. 4005-4006 (2002).
46. T. D. Williams, J. E. Caunter, A. D. Lillicrap, T. H. Hutchinson, E. G. Gillings and S. Duffell, Evaluation of the reproductive effects of tamoxifen citrate in partial and full life-cycle studies using fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Environ. Toxicol. Chem.* **26**, pp. 695-707 (2007).
47. G. T. Ankley, D. L. Defoe, M. D. Kahl, K. M. Jensen, E. A. Makynen, A. Miracle, P. Hartig, L. E. Gray, M. Cardon and V. Wilson, Evaluation of the model anti-androgen flutamide for assessing the mechanistic basis of responses to an androgen in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Environ. Sci. Technol.* **38**, pp. 6322-6327 (2004).
48. W. Kuhnz and S. Beier, Comparative progestational and androgenic activity of norgestimate and levonorgestrel in the rat, *Contraception* **49**, pp. 275-289 (1994).
49. A. J. Rapkin, S. N. Sorger and S. A. Winer, Drospirenone/ethinyl estradiol, *Drugs Today (Barc. )* **44**, pp. 133-145 (2008).
50. R. Krattenmacher, Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen, *Contraception* **62**, pp. 29-38 (2000).
51. P. Muhn, R. Krattenmacher, S. Beier, W. Elger and E. Schillinger, Drospirenone: A novel progestogen with antimineralocorticoid and antiandrogenic activity : Pharmacological characterization in animal models, *Contraception* **51**, pp. 99-110 (1995).
52. OECD, Series on Testing and Assessment Number 61- Report of the Validation of the 21-day fish screening assay for the detection of endocrine substances Phase1b., *OECD* (2006).
53. 1. US EPA, Fish life-cycle toxicity tests., *US EPA, Cincinnati, OH. EPA 540/9-86-137*, (1986).
54. 2. US EPA, A short-term method for assessing the reproductive and developmental toxicity of endocrine-disrupting chemicals using the fathead minnow (*Pimephales promelas*)., *US EPA, Cincinnati, OH. EPA-600/R-01/067*, (2002).
55. V. J. Kramer, S. Miles-Richardson, S. L. Pierens and J. P. Giesy, Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17[ $\beta$ ]-estradiol, *Aquat. Toxicol.* **40**, pp. 335-360 (1998).
56. OECD, Revised Draft OECD Guideline for the Testing of Chemicals- The Fish Screening Assay for Endocrine Active Substances, *OECD* (2008).
57. R. L. Leino, K. M. Jensen and G. T. Ankley, Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Environm. Toxicol. Pharmacol.* **19**, pp. 85-98 (2005).
58. L. T. M. Van der Ven, H. Holbech, M. Fenske, E.-J. Van den Brandhof, F. K. Gielis- Proper and P. W. Wester, Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: evaluation

- by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation, *Aquat. Toxicol.* **65**, pp. 1-11 (2003).
59. C. E. Purdom, P. A. Hardiman, V. V. J. Bye, N. C. Eno, C. R. Tyler and J. P. Sumpter, Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works, *Chem. Ecol.* **8**, pp. 275-285 (1994).
  60. T. Wahli, W. Meier, H. Segner and P. Burkhardt-Holm, Immunohistochemical Detection of Vitellogenin in Male Brown Trout from Swiss Rivers, *The Histochem. Journal* **30**, pp. 753-758 (1998).
  61. U. Bieberstein, T. Berbner, M. Islinger and T. Braunbeck, Immunohistochemical localization of vitellogenin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using immunofluorescence, *Sci. Total Environm.* **233**, pp. 67-75 (1999).
  62. K. Kobayashi, S. Tamotsu, K. Yasuda and T. Oishi, Vitellogenin-immunohistochemistry in the liver and the testis of the medaka, *Oryzias latipes*, exposed to 17beta-estradiol and p-nonylphenol, *Zoolog. Sci.* **22**, pp. 453-461 (2005).
  63. K. Fent, Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples, *Toxicology in Vitro* **15**, pp. 477-488 (2001).
  64. A. S. Leong and P. N. Gilham, The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens, *Pathology* **21**, pp. 266-268 (1989).
  65. Romeis, Benno. *Mikroskopische Technik* (16. Aufl.). 1968. München, R. Oldenbourg Verlag.
  66. B. Borg, Androgens in teleost fishes, *Comp. Biochem. Phys. Part C: Comp. Pharmacol. Toxicol.* **109**, pp. 219-245 (1994).
  67. K. M. Jensen, E. A. Makynen, M. D. Kahl and G. T. Ankley, Effects of the feedlot contaminant 17alpha-trenbolone on reproductive endocrinology of the fathead minnow, *Environ. Sci. Technol.* **40**, pp. 3112-3117 (2006).
  68. R. Sitruk-Ware, Pharmacology of different progestogens: the special case of drospirenone, *Climacteric* **8**, pp. 4-12 (2005).
  69. K. M. Jensen, M. D. Kahl, E. A. Makynen, J. J. Korte, R. L. Leino, B. C. Butterworth and G. T. Ankley, Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow, *Aquat. Toxicol.* **70**, pp. 99-110 (2004).
  70. M. Seki, H. Yokota, H. Matsubara, M. Maeda, H. Tadokoro and K. Kobayashi, Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*), *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, pp. 774-781 (2004).
  71. K. L. Thorpe, R. Benstead, T. H. Hutchinson and C. R. Tyler, Associations between altered vitellogenin concentrations and adverse health effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Aquat. Toxicol.* **85**, pp. 176-183 (2007).
  72. J. E. Harries, T. Runnalls, T. Hill, C. A. Harris, S. Maddix, J. P. Sumpter and C. R. Tyler, Development of a Reproductive Test for Endocrine Disrupting Chemicals Using

- Pair-Breeding Fathead Minnow (*Pimephales promelas*), *Environ. Sci. Technol.* **34**, pp. 3003-3011 (2000).
73. R. Bogers, S. Vries-Buitenweg, M. Van Gils, E. Baltussen, A. Hargreaves, B. van de Waart, D. De Roode, J. Legler and A. Murk, Development of chronic tests for endocrine active chemicals: Part 2: An extended fish early-life stage test with an androgenic chemical in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Aquat. Toxicol.* **80**, pp. 119-130 (2006).
74. J. C. Brodeur, K. B. Woodburn, F. Zhang, M. J. Bartels and G. M. Klecka, Plasma sampling and freezing procedures influence vitellogenin measurements by enzyme-linked immunoassay in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, pp. 337-348 (2006).
75. G. H. Panter, T. H. Hutchinson, K. S. Hurd, J. Bamforth, R. D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno and C. R. Tyler, Development of chronic tests for endocrine active chemicals Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Aquat. Toxicol.* (2006).
76. U. Bieberstein, Effects of estrogenic chemicals on fish : investigation of reproduction parameters on rainbow trout and zebrafish, University of Heidelberg, (2001).
77. B. Bolon and M. B. Mays, Conjugated avidin-peroxidase as a stain for mast cell tumors, *Vet. Pathol.* **25**, pp. 523-525 (1988).
78. J. Walter, Epikrisis of epithelial neoplasms of the dog : epidemiological, biochemical and immunohistochemical examinations, FU Berlin, (1998).
79. G. Lang, Immunhistochemie, Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. In Springer Vienna (2006).
80. R.J.Roberts, *Fish Pathology* (3 Edn). W.B. Saunders, London (2001).
81. L. T. Van der Ven, P. W. Wester and J. G. Vos, Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*), *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, pp. 908-913 (2003).
82. Van der Ven, Leo T. M. and Wester, P. W. TOXICOLOGICAL PATHOLOGY ATLAS of SMALL LABORATORY FISH with special reference to normal histology and effects of endocrine disruption in the ZEBRAFISH (*Danio rerio*). 2002 [http://arch.rivm.nl/milieu/rivmzfatlas/fishtoxpat/index\\_uk.html](http://arch.rivm.nl/milieu/rivmzfatlas/fishtoxpat/index_uk.html)
83. W. Kuhnz and H. Gieschen, Predicting the oral bioavailability of 19-nortestosterone progestins in vivo from their metabolic stability in human liver microsomal preparations in vitro, *Drug Metab. Dispos.* **26**, pp. 1120-1127 (1998).
84. A. E. Schindler, C. Campagnoli, R. Druckmann, J. Huber, J. R. Pasqualini, K. W. Schweppe and J. H. H. Thijssen, Classification and pharmacology of progestins, *Maturitas* **46**, pp. 7-16 (2003).
85. K. Fotherby, Levonorgestrel. Clinical pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinet.* **28**, pp. 203-215 (1995).
86. S. O. L. A. MIGUEL-QUERALT and G. L. HAMMOND, Sex hormone-binding globulin in fish gills is a portal for sex steroids breached by xenobiotics, *Endocrinology* (2008).

87. EMEA. Guideline on environmental risk assessment of medicinal products for human use. CPMP/SWP/4447/00, London. 2006.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1.1: Ganzkörperquerschnitt einer weiblichen Dickkopfritze (Vergrößerung x 2,5, Kontrolltier aus Reproduktionstest, siehe Kap. 3.2.2). O= Ovar, SB= Schwimmblase, D= Darmanschnitte. ....                                                                                      | 12 |
| Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer Oocyte und dem intakten ovariellen Follikel. Nach Tyler & Sumpter, 1996 [34] und Arukwe & Goksør, 2003 [35]. ....                                                                                                                         | 13 |
| Abbildung 1.3: Oocytenstadien einer Dickkopfritze (Vergrößerung x 40, Kontrolltier aus Reproduktionstest, siehe Kap. 3.2.2). 1. Primäre Oocyten; 2.+3. Prävitellogene Oocyte; 4. Vitellogene Oocyte; 5. Atretische Oocyte. ....                                                         | 15 |
| Abbildung 1.4: Hoden einer Dickkopfritze, Querschnitt (Vergrößerung x 40, (Kontrolltier aus Reproduktionstest, siehe Kap. 3.2.2). Spermazocysten mit 1. Spermatogonien; 2. primären Spermatoocyten; 3. Sekundären Spermatoocyten; 4. reifen Spermatozoen im Tubuluslumen. ....          | 16 |
| Abbildung 1.5: Ganzkörperquerschnitt einer männlichen Dickkopfritze (Vergrößerung x 2,5, (Kontrolltier aus Reproduktionstest, siehe Kap. 3.2.2). H= Hoden, L= Leber, D= Darmanschnitte, N= Niere, M=Muskulatur, R= Rückenmark. ....                                                     | 16 |
| Abbildung 1.6: Endokrine Regulation beim Fisch. E2= Estradiol-17 $\beta$ ; GnRH= "Gonadotropin releasing hormone"; GtH= Gonadotropin; KT= 11-Ketotestosteron; T= Testosteron; 17,20 $\beta$ -DP= 17,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-Pregnen-3-on; VTG= Vitellogenin. Nach Kime, 1999 [17]. .... | 18 |
| Abbildung 1.7: Hormonelle Regulation des Oocytenwachstums (Vitellogenese) beim Fisch. Nagahama (1994) [18]. ....                                                                                                                                                                        | 19 |
| Abbildung 1.8: Hormonelle Regulation der Spermienmotilität bei Salmoniden. Nach Nagahama, 1994 [18]. ....                                                                                                                                                                               | 20 |
| Abbildung 3.1: Weibliche und männliche Fettkopfbrasse ( <i>Pimephales promelas</i> ) mit Laichhöhle. ....                                                                                                                                                                               | 26 |
| Abbildung 3.2: Versuchsaufbau 21-Tage Reproduktions-Test. ....                                                                                                                                                                                                                          | 28 |
| Abbildung 3.3: ELS-Apperatur mit zwei Zylindern pro Becken, die Zylinder sind mit einer Gaze verschlossen (400 $\mu$ m). ....                                                                                                                                                           | 32 |
| Abbildung 3.4: Versuchsaufbau (Aufzuchtphase Jungfische, Tag 30) des Zwei-Generationen-Tests am Fisch. ....                                                                                                                                                                             | 34 |
| Abbildung 3.5: Schematischer Ablauf des Zwei-Generationen-Tests am Fisch; Phasen und Probennahmen. ....                                                                                                                                                                                 | 35 |
| Abbildung 3.6: Prinzip des Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, HRP= Horse reddish peroxidase, VTG= Vitellogenin, AK= Antikörper. Nach: Biosense, Norwegen. ....                                                                                                                         | 46 |
| Abbildung 3.7: Sektionsschema ....                                                                                                                                                                                                                                                      | 48 |
| Abbildung 4.1: Sekundäre Geschlechtsmerkmale: A: Kontroll-Männchen; B: Kontroll-Weibchen; C: maskulinisiertes Weibchen mit Nuptialtuberkeln nach Exposition gegenüber 100 ng/L LNG (nominal). ....                                                                                      | 60 |
| Abbildung 4.2: Reproduktive Effekte von Levonorgestrel, Eiablage; Vorlauf- und Expositionsphase, 0,8- 30,0 ng/L (gemessene Konzentrationen). Für alle p<0,0001im Vergleich zur Kontrolle. ....                                                                                          | 61 |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 4.3: Reproduktive Effekte von Levonorgestrel: Eier pro Paar und Woche der Expositionsphase, weiß: Tag 1-7, grau: Tag 8-14, schwarz: Tag 15-21; (gemessene Konzentrationen).....                                                                                                                                                                                                                      | 61 |
| Abbildung 4.4.: Histologie der Gonaden; A: Schnitt eines Kontroll-Ovars; B: nach Exposition gegenüber 30 ng/L LNG; C: Hoden eines Kontroll-Männchens; D: Nach Exposition gegenüber 30 ng/L LNG. PG= Primäre Oocyten, PV= Prävitellogene Oocyte, VO= Vitellogene/ reife Oocyte, AF= präovulatorischer atretischer Follikel, MP= Makrophagen, SG= Spermatogonien, SC= Spermatozyten, MS= reife Spermatozoen..... | 63 |
| Abbildung 4.5: Schlupferfolg der eingesetzten Eier unter Behandlung mit LNG in %, je zwei Zylinder (a,b) pro Konzentration. Gruppe 1 (LW-Kontrolle), Gruppe 2 (0,7 ng/L), Gruppe 3 (22,0 ng/L), Gruppe 4 (29,7 ng/L).....                                                                                                                                                                                      | 65 |
| Abbildung 4.6: Konditionsfaktor CF (CF= Gewicht (g) / Länge (mm) x 100) der gemessenen und gewogenen Tiere im Zwei-Generationen-Test zu den drei Probenahmezeitpunkten. Oben: Tag 30, Mitte: Tag 56; Unten: Tag 160.....                                                                                                                                                                                       | 67 |
| Abbildung 4.7: Reproduktionserfolg der geschlechtsreifen Tiere in der Reproduktionsphase des Zwei-Generationen-Tests unter Exposition gegenüber LNG, mittlere und höchste Dosis ohne Reproduktionserfolg. ....                                                                                                                                                                                                 | 68 |
| Abbildung 4.8: Schlupferfolg der F <sub>1</sub> im Zwei-Generationen-Test; Kontrolle (1a, b) und 0,7 ng/L LNG (2a, b).....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 69 |
| Abbildung 4.9: Ein Männchen/Weibchen jeder Konzentration am Expositionsende Tag 160 n.S. Oben: Männchen, Unten: Weibchen. A: Kontrolle; B: 0,7 ng/L, Weibchen mit vergrößertem Bauchumfang; C: 22,0 ng/L, Weibchen mit vergrößertem Bauchumfang, dunkler Rückenflosse und Nuptialtuberkeln; D: 29,7 ng/L Weibchen mit vergrößertem Bauchumfang, dunkler Rückenflosse, Fatpad-Ansatz und Nuptialtuberkeln. .... | 70 |
| Abbildung 4.10: Histologische Bestimmung des Geschlechterverhältnisses der adulten Fische am Expositionsende des Zwei-Generationen-Tests (Tag 160 nach Schlupf).....                                                                                                                                                                                                                                           | 71 |
| Abbildung 4.11: Zwei-Generationen-Test; Ovar eines mit 22 ng/L LNG behandelten Weibchens; O= Oocyten, H= Hodengewebe .....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 72 |
| Abbildung 4.12: Zwei-Generationen-Test; Ovar eines mit 22 ng/L LNG behandelten Weibchens; S= reife Spermatozoen (Vergrößerung x 40) .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 72 |
| Abbildung 4.13: Zwei-Generationen-Test; Hodengewebe von Fischen mit prävitellogenen Oocyten (=O) nach Behandlung mit 29,7 ng/L LNG am Tag 160 nach Schlupf (Vergrößerung x 20). ....                                                                                                                                                                                                                           | 73 |
| Abbildung 4.14: Reproduktive Effekte von Dienogest: Mittlere Anzahl Eier pro Gelege in der Vorlauf- und Expositionsphase, 65 - 510 ng/L (gemessen). Links: Vorlaufphase, Rechts: Expositionsphase. ....                                                                                                                                                                                                        | 75 |
| Abbildung 4.15: Reproduktive Effekte von Dienogest: Anzahl Eier pro Gelege, links: Vorlaufphase, rechts: Expositionsphase; p(293 ng/L)=0,0394 und p(510 ng/L) =0,0054. ....                                                                                                                                                                                                                                    | 76 |
| Abbildung 4.16: Reproduktive Effekte von Dienogest: Anzahl Eier pro Paar und Woche der Expositionphase, weiß= Tag 1-7, grau= Tag 8-14, schwarz= Tag 15-21.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 76 |
| Abbildung 4.17: Histologie der Gonaden; A: Schnitt eines Kontroll-Ovars; B: nach Exposition gegenüber 510 ng/L DNG; C: Hoden eines Kontroll-Männchens; D: Nach Exposition gegenüber 510 ng/L DNG. ....                                                                                                                                                                                                         | 78 |
| Abbildung 4.18: Reproduktive Effekte von 0,33- 70,0 µg/L Drospirenon: Reproduktionserfolg. Links: Vorlaufphase, Rechts: Expositionsphase. p <sub>6,5</sub> = 0,0005, p <sub>70</sub> =0,0001.....                                                                                                                                                                                                              | 80 |
| Abbildung 4.19: Reproduktive Effekte von Drospirenon: Eier pro Paar und Woche der Expositionphase, weiß: Tag 1-7, grau: Tag 8-14, schwarz: Tag 15-21. ....                                                                                                                                                                                                                                                     | 80 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 4.20: Histologie der Gonaden; A: Schnitt eines Kontroll-Ovars; B: nach Exposition gegenüber 70 µg/L DRSP; C: Hoden eines Kontroll-Männchens; D: Nach Exposition gegenüber 70 µg/L DRSP. PG= Primäre Oocyte, PV= Prävitellogene Oocyte, VO= Vitellogene/ reife Oocyte, AF= präovulatorischer atretischer Follikel, SG= Spermatogonien, SC= Spermatozyten, MS= reife Spermatozoen. .... | 82 |
| Abbildung 4.21: Dosis-Wirkungskurven der estrogenen Aktivität der getesteten Fischfutter; A: am ER $\alpha$ ; B: am ER $\beta$ . ....                                                                                                                                                                                                                                                           | 83 |
| Abbildung 4.22: Standardkurve des VTG-ELISA. $\text{Log}(y) = A + B * \text{Log}(x)$ : A= -0,179; B= 0,853; R <sup>2</sup> = 0,982. ....                                                                                                                                                                                                                                                        | 84 |
| Abbildung 4.23: VTG-Konzentrationen unbehandelter und mit 20 ng/L LNG behandelter Fische (Zwei-Generationen-Test); logarithmische Darstellung. ....                                                                                                                                                                                                                                             | 85 |
| Abbildung 4.24: Vergleich der VTG-Konzentrationen unbehandelter und mit 510 ng/L DNG (gemessen) behandelter Fische; logarithmische Darstellung. ....                                                                                                                                                                                                                                            | 86 |
| Abbildung 4.25: Immunhistochemischer Nachweis von Cytochrom P450 1A mit dem Maus-Anti-Fisch-CYP1A-AK A: im Darmepithel einer Dickkopfelritze, Kontrollweibchen. B: Negativkontrolle ohne Antikörper. ....                                                                                                                                                                                       | 87 |
| Abbildung 4.26: Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Karpfen-Vitellogenin-AK in einer vitellogenen Oocyte einer Dickkopfelritze. A: Selektive Anfärbung der Dottervakuolen (DV), CV= cortical-alveoläre Vesikel, PO= primäre Oocyte, Kontrollweibchen. B: Negativkontrolle. ....                                                                                    | 89 |
| Abbildung 4.27: A: Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-Vitellogenin-AK in einer vitellogenen Oocyte einer Dickkopfelritze, Kontrollweibchen. B: Negativkontrolle. ....                                                                                                                                                                                  | 89 |
| Abbildung 4.28: Detail; Immunhistochemischer Nachweis des Dotterproteins Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Karpfen- VTG-AK in einer vitellogenen Oocyte einer Dickkopfelritze, Kontrollweibchen (Vergrößerung x 40). ....                                                                                                                                                                          | 90 |
| Abbildung 4.29: Detail; Immunhistochemischer Nachweis des Dotterproteins Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-VTG-AK in einer vitellogenen Oocyte einer Dickkopfelritze, Kontrollweibchen (Vergrößerung x 40). ....                                                                                                                                                                        | 90 |
| Abbildung 4.30: Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-VTG-AK in der Leber von weiblichen (links) und männlichen (rechts) Dickkopfelritzen (Vergrößerung x 40). Von Oben nach unten: A: Negativkontrolle, B: Kontrolle und C: 20 ng/L Levonorgestrel. ....                                                                                                 | 91 |
| Abbildung 4.31 Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-VTG-AK in Hoden von männlichen Dickkopfelritzen, 20 ng/L LNG (Vergrößerung x 40); keine positive Reaktion. ....                                                                                                                                                                                      | 92 |
| Abbildung 4.32: Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin mit dem Maus-Anti-Zebrafisch-VTG-AK in atretischem Follikel einer weiblichen Dickkopfelritze, 20 ng/L LNG (Vergrößerung x 40). ....                                                                                                                                                                                              | 93 |

## 7.2 Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 3.1.: Substanzeigenschaften Levonorgestrel .....                                                                                                                                                                                      | 22 |
| Tabelle 3.2: Substanzeigenschaften Dienogest .....                                                                                                                                                                                            | 23 |
| Tabelle 3.3: Substanzeigenschaften Drospirenon .....                                                                                                                                                                                          | 24 |
| Tabelle 3.4: Pipettierschema mit den mitgeführten Verdünnungen von Test- und Referenzsubstanzen. E <sub>2</sub> = Estradiol, TS <sub>1/2</sub> = Testsubstanzen, ICI= SERD (Selektiver Estrogen-Rezeptor Destabilisator; ER Antagonist) ..... | 44 |
| Tabelle 3.5: Plattenbelegung ELISA. Gelb: Nicht-spezifische Bindung; Grün: Standard-Reihe; Blau: Reptest DNG; Grau: FFCL mit LNG. ....                                                                                                        | 46 |
| Tabelle 4.1: Übersicht über die mittlere Wiederfindung der Testsubstanz LNG in Reproduktionstests und Life-Cycle-Exposition. ....                                                                                                             | 58 |
| Tabelle 4.2: Ergebnisübersicht aus drei Reproduktionstests mit verschiedenen getesteten Konzentrationen der Prüfsubstanz LNG. ....                                                                                                            | 59 |
| Tabelle 4.3: Ovarien von Weibchen der Kontrolle und höchsten Dosis LNG; Anteil der verschiedenen Reifestadien (%). Die niedrige und mittlere Konzentration wurde nicht untersucht. ....                                                       | 63 |
| Tabelle 4.4: Kumulative Mortalität, Wachstum und Geschlechterverhältnis (morphologisch/histologisch) der F <sub>0</sub> am Tag 160. ....                                                                                                      | 66 |
| Tabelle 4.5: Ovarien von Weibchen der Kontrolle und der drei Konzentrationen DNG; mittlerer Anteil der verschiedenen Reifestadien (%). ....                                                                                                   | 78 |
| Tabelle 4.6: Ovarien von Weibchen der Kontrolle und der drei Konzentrationen DRSP; mittlerer Anteil der verschiedenen Reifestadien (%). ....                                                                                                  | 82 |

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

|                  |                                                      |
|------------------|------------------------------------------------------|
| AK               | Antikörper                                           |
| AP               | Alkalische Phosphatase                               |
| AR               | Androgenrezeptor                                     |
| BSA              | Bovines Serumalbumin                                 |
| cAMP             | Zyklisches Adenosinmonophosphat                      |
| CF               | Konditionsfaktor Gewicht (g) / Länge (mm) x 100      |
| CYP1A            | Cytochrom P450 1A                                    |
| DAB              | Diaminobenzidin (Chromogen-Lösung)                   |
| DNG              | Dienogest                                            |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                                     |
| D-MEM            | <i>Dulbecco's</i> Medium                             |
| DRSP             | Drospirenon                                          |
| E <sub>2</sub>   | Estradiol                                            |
| ECD              | “Endocrine disruptor“                                |
| ED <sub>50</sub> | Effektivdosis 50%                                    |
| EDTA             | Ethylendiamintetracetat                              |
| ELISA            | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                    |
| EMA              | European Medicines Agency                            |
| ER               | Estrogenrezeptor                                     |
| FFLC             | “Fish Full Life Cycle Test“, Zwei-Generationen-Test  |
| FKS (CSS)        | Fetales Kälberserum                                  |
| GVBD             | “Germinal vesicle breakdown“, Keimbläschen-Untergang |
| HIER             | “Heat induced Epitope Retrieval Solution“            |
| HPLC             | “High pressure liquid Chromatography“                |
| HRP              | “Horse Reddish-Peroxidase“                           |

|            |                                                                 |
|------------|-----------------------------------------------------------------|
| HRT        | Hormon-Ersatz-Therapie                                          |
| IUPAC      | Internationale Union für reine und angewandte Chemie            |
| KLH        | “Keyhole Limpet Hemocyanin“                                     |
| LC         | “Liquid Chromatography“                                         |
| LNG        | Levonorgestrel                                                  |
| LOAEL      | “Lowest observed adverse effect level“                          |
| LOQ        | “Limit of Quantification“, Bestimmungsgrenze                    |
| MS         | Massenspektrometrie                                             |
| MS 222     | Ethyl-3-aminobenzoat-methansulfonat                             |
| ng         | Nanogramm                                                       |
| NOEC       | “No-observed-effect-concentration“                              |
| OECD       | Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung |
| PEC        | “Predicted environmental concentration“                         |
| PNEC       | “Predicted no effect concentration“                             |
| PBS        | Phosphatgepufferte Salzlösung pH 7.4                            |
| POAF       | Prä-ovulatorischer atretischer Follikel                         |
| PR         | Progesteronrezeptor                                             |
| PSG        | L-Glutamin, 4nM                                                 |
| SHBG       | “Plasma sex steroid binding globuline“                          |
| TBS        | Trispufferlösung                                                |
| VTG        | Vitellogenin                                                    |
| µg         | Microgramm                                                      |
| 17α,20β-DP | 17α,20β-Dihydroxy-Progesteron                                   |
| 11-KT      | 11-Ketotestosteron                                              |

## **7.4 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Jana Zeilinger, geb. Pohle, 21.04.1978 in Düsseldorf, dass dies-  
abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Betreuer und Doktorvater-  
meine eigenen Arbeit ist und ich zuvor noch keinen Versuch der Promotion unternommen  
habe.