Robert Kase

Entwicklung eines ökotoxikologischen Testsystems mit der Entenmuschel (Anodonta anatina) zur Erfassung funktioneller Immuntoxizität



Cuvillier Verlag Göttingen

Entwicklung eines ökotoxikologischen Testsystems mit der Entenmuschel (*Anodonta anatina*) zur Erfassung funktioneller Immuntoxizität

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften Fachbereich 3: Mathematik/Naturwissenschaften Universität Koblenz-Landau

Vorgelegt

am 12.11.2007 von Robert Kase

geb. am 22.02.1976 in Neu-Kaliß

Referent: PD Dr. rer. nat. Werner Manz, Universität Koblenz-Landau

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Braunbeck, Universität Heidelberg

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <u>http://dnb.ddb.de</u> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2007 Zugl.: Koblenz-Landau, Univ., Diss., 2007

978-3-86727-481-4

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2007 Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen Telefon: 0551-54724-0 Telefax: 0551-54724-21 www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen. 1. Auflage, 2007 Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-481-4

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	14
Abkürzungen	17
Zusammenfassung	18
Summary	19
1 EINLEITUNG	20
1 1 Ökotovikologie als multidiszinlinäre Wissenschaft	20
1.1.1. Ökotovikologie und die ökotovikologischen Wirkungsehenen	20
1.1.2 Der chemisch numerische und der ökotoxikologische Ansatz zur Erfassung von Belas	20
	21
1.1.3 Bedeutung der biologischen Wirkungstests und Wirkrichtungen	
1.2 Immunstatus und aquatische Immuntoxikologie mit Muscheln	23
1.2.1 Immunstatus von Organismen und Immuntoxikolgie	23
1.2.2 Muscheln als Modellorganismen für die aquatische Toxikologie	
1.2.3 Das Immunsystem von Muscheln	
1.2.4 Funktionelle Ansätze zur Messung von Immunleistungen in Muscheln	27
1.2.4.1 Zellvermittelte Immunantworten der Hämozyten	
1.2.4.2 Humorale Immunantwort und Produktion von Reactive Oxygen Species (ROS)	
1.2.5 Nachgewiesene Umwelteinflüsse auf den Immunstatus von Muscheln	32
1.3 Vorgehensweise	35
1.3.1 Erfahrungsstand zu Beginn der Untersuchungen	
1.3.2 Ziele und Aufgaben	
1.3.3 Durchführung und Fragestellungen der Untersuchungen	
2 MATERIAL UND METHODEN	39
2.1 Mess- und Testprinzip zum durchflusszytometrischen Ansatz	39
2.1.1 Messprinzip der Durchflusszytometrie	39
2.1.2 Testprinzip zur Messung der Phagozytoseaktivität von Immunzellen	41
2.2 Methoden mit Säugerimmunzellen	42
2.2.1 Verwendung der HL 60-Zelllinie zur Erarbeitung von Phagozytoseparametern	
2.2.2 Herkunft der HL 60-Zellen	
2.2.3 Kultivierung und Wachstum der HL 60-Zellen	
2.2.4 Vitalitätsbestimmung von HL 60-Zellen	
2.2.5 Phagozytoseansatz mit HL 60-Zellen	
2.2.6 Differenzierungsstimuli für HI 60-Zellen	49
2.2.7 Die P388-Mausmakrophagenzelllinie	49

2.3 Methoden der Muschelexperimente	. 50
2.3.1 Klassifizierung und Herkunft der Testorganismen	. 51
2.3.2 Erfassung der biometrischen Daten	. 53
2.3.3 Hälterung der Entenmuscheln	. 55
2.3.3.1 Rheinwasserhälterung der Entenmuscheln	. 55
2.3.3.2 Laborhälterung der Entenmuscheln	. 56
2.2.3.3 Expositionshälterung der Entenmuscheln mit Referenzsubstanzen	. 59
2.3.3.4 Expositionhälterung der Entenmuscheln mit Abwasserproben	. 60
2.3.4 Statistik der Expositionsmessparameter	. 63
2.3.5 Bioakkumulationsuntersuchungen nach Muschelexposition mit Referenzsubstanzen	. 64
2.3.5.1 Bestimmung von Nickel durch Atomabsorptionsspektrometrie nach elektrothermischer	
Atomisierung	. 66
2.3.5.2 Bestimmung von Quecksilber durch Atomabsorptionsspektrometrie ohne Anreicherung	69
2.3.5.3 Berechnung der Bioakkumulationsfaktoren	. 72
2.3.6 Hämolymphentnahme	. 72
2.3.7 Plattierungsversuch von Hämolymphe	. 74
2.4 Methoden mit Muschelhämozyten	. 74
2.4.1 Zellzahlbestimmungen der Hämolymphe	. 76
2.4.1.1 Bestimmung der vitalen Hämozytenzahl in der Neubauer-Zählkammer	. 76
2.4.1.2 Bestimmung der Partikelzahl mit dem Coulter Counter	. 76
2.4.1.3 Bestimmung der Vitalitätsabnahme von Hämozytenprimärkulturen	. 77
2.4.1.4 Bestimmung des Adhäsionsverhaltens von Hämozyten	. 77
2.4.2 Mikroskopische Untersuchungen der Hämozyten	. 77
2.4.3 Phagozytoseansatz mit Muschelhämozyten	. 78
2.4.4 In vitro-Hemmversuche mit Muschelhämozyten	. 79
2.4.5 Vorbereitung der Testansätze für die durchflusszytometrische Messung	. 80
2.4.6 Durchflusszvtometrische Messung der Testansätze	. 82
2.4.7 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) von Muschelhämozyten mit Phenolrot	. 82
2.4.7.1 Testprinzip zur Messung der ROS Produktion von Immunzellen	. 82
2.4.7.2 Bestimmung des Arbeitsbereiches der Phenolrotmethode	. 84
2.4.7.3 Stimuliversuche mit Mischhämolymphe	. 85
2 4 7 4 Schwermetallwirkungen auf die ROS-Produktion von Muschelhämozyten	86
2 4 7 5 Allgemeine Methode der Auswertung	88
	~~
3 ERGEBNISSE	89
2.4 Engel view Entwicklung und Velidienung eines In situs Testus febrens	~~
3.1 Ergebnisse zur Entwicklung und Validierung eines <i>in vitro</i> -Testverfahrens	. 89
3.1.1 Ergebnisse mit den Saugerimmunzeilen	. 89
3.1.1.1 Wachstum und Vitalität der HL60-Zellen	. 89
3.1.1.2 Phagozytoseaktivitat von HL60-Zellen	. 90
3.1.1.3 Kinetik der Fluoreszenzzunahme durch Phagozytoseakivitat von HL 60-Zellen	. 94
3.1.1.4 Temperatureinfluss auf die Phagozytoseakivität von HL 60-Zellen	. 95
3.1.1.5 Differenzierungsproblematik und Verwendung von P388-Mausmakrophagen	. 95
3.1.2 Hamolymphgewinnung aus Muscheln	. 96
3.1.3 Zusammensetzung der Hamolymphe	. 97
3.1.4 Punktionstolgen	. 99
3.1.4.1 Degeneration des vorderen Schließmuskels	. 99
3.1.4.2 Eintrag von Mikroorganismen in die Einstichstelle	100

3.1	.4.3 Vitalitätsabnahme der Hämozyten in der Primärkultur	101
3.1	.4.4 Bestimmung der Regenerationsfähigkeit der Messparameter Phagozytoseleistung und	
	mittlerer vitaler Hämozytendichte nach erfolgter Punktion	102
3.1.5	Adhäsionsverhalten der Hämozyten	103
3.1.6	Methodische Einflüsse auf die Phagozytoseaktivität von Hämozyten	104
3.1	.6.1 Relativer Einfluss einer Veränderung der Hämozytenzahl auf die durchflusszytometris	che
	Messung	104
3.1	.6.2 Relativer Einfluss einer Erhöhung des Serumanteils (Opsonisierung) und zusätzlicher	
	Verdopplung des Beadanteils auf durchflusszytometrische Messparameter im 12500	
	Hämozytenansatz	105
3.1	.6.3 Relativer Einfluss einer Erhöhung des Serumanteils (Opsonisierung) und zusätzlicher	
	Verdopplung des Beadanteils auf durchflusszytometrische Messparameter im 50000	
	Hämozytenansatz	106
3.1	.6.4 Kinetik von Phagozytoseaktivität und Adhäsion von Hämozyten	107
3.1	.6.5 Temperatureinfluss auf die Phagozytosekinetik von Muschelhämozyten	108
3.1	.6.6 Korrelation der Messparameter bei unterschiedlichen Hälterungstemperaturen	110
3.1	.6.7 Temperatureinfluss der Versuchstemperatur auf die Phagozytoseaktivität von	
	unterschiedlich adaptierten Entenmuscheln	112
	3.1.6.8 Einfluss von generellen Versuchsbedingungen auf die Phagozytoseaktivität von	
	Immunzellen	113
3.1.7	Vitalitätsergebnisse	114
3.1.8	ROS-Produktion von Muschelhämozyten	115
3.1	.8.1 Zusammenhang zwischen H_20_2 -Stoffmenge im Testansatz und der Extinktion in der	
	Phenolrotmethode	115
3.1	.8.2 Kinetikverlauf der ROS-Produktion in Abhängigkeit von der Hämozytenzahl im	
		116
3.1	.8.3 Stimuliversuche mit der ROS-Produktion von Hamozyten	118
3.1	.8.4 Kinetik der ROS-Produktionen von Einzeinamolymphen ohne Stimulus aus der	440
	Rneinwassernaiterung	119
3.2 Effe	kte von Umweltchemikalien <i>in vitro</i>	120
3.2.1	Effekte von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von P388- Mausmakrophagen	120
3.2.2	Effekte von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten	121
3.2	.2.1 Effekte von Schwermetallen auf die Messparameter der Phagozytoseaktivität von	
	Muschelhämozvten	122
3.2.3	Regenerationsexperiment zur Wirkung von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung v	on
	Muschelhämozyten	125
3.2.4	In vitro-Effekte ausgewählter Umweltchemikalien auf die Phagozytoseleistung von	
	Muschelhämozyten	126
3.2.5	In vitro-Effekte von Schwermetallverbindungen auf die ROS-Produktion von	
	Muschelhämozyten	127
3.3 In v	ivo-Effekte ausgesuchter Schwermetalle auf die Phagozytoseleistung von	
Ente	enmuscheln	128
3.3.1	In vivo- Effekte des Methylquecksilberchlorids auf die Phagozytoseleistung von	
	Entenmuscheln	128
3.3.2	In vivo-Effekte von Nickeldichlorid auf die Phagozytoseleistung von Entenmuscheln	130
3.3.3	Verlauf der Phagozytoseleistung in vivo ohne Referenzsubstanz	133
3.3.4	Bioakkumulationsergebnisse der Expositionsszenarien mit Methylquecksilberchlorid	134
3.3.5	Bioakkumulationsergebnisse der Expositionsszenarien mit Nickeldichlorid	136

3.4 In vivo-Effekte von Abwasserproben	137
3.4.1 Abwasserversuche mit Testsystemen für allgemein toxische Effekte	137
3.4.2 In vivo-Abwasserversuche mit Anodonta anatina zur Erfassung immunmodulieren	nder Effekte 138
3.4.3 Regeneration der Immunparameter nach dreiwöchiger Laborhälterung, im Ansch	luss an eine
zweiwöchige Abwasser- und Referenzsubstanzexposition	142
3.5 Saisonalitäten in der Rheinwassermuschelhälterung	
3.5.1 Abiotische Faktoren der Rheinwasserhälterung	
3.5.2 Biotische Faktoren der Rheinwassermuschelhälterung	148
3.5.3 Korrelationsananalysen der Messparameter Temperatur, Phagozytosleistung und	d vitaler
Hämozytenzahl für die Zeitintervalle KW 13-27; 29-41 und 43-51	150
3.5.4 Vergleich zwischen den Messparametern Phagozytoseleistung und vitaler Hämo	zytendichte
in Labor- und Rheinwasserhälterung	
4 DISKUSSION	155
4.1 In vitro-Versuche mit Säugerimmunzellen	155
4.2. In vitro-Versuche mit Muschelhämozyten	156
4.2 1 Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten	157
4.2.2 Gewinnung der Hämozyten	157
4.2.2 Ocwinning der Hamozyten	158
4.2.4 Temperatureinfluss auf die Phagozytoseaktivität	159
4 2 5 Vitalitätsmessungen von Muschelhämozyten	161
4.2.6 Versuche mit Xenobiotika	161
4.2.7 Die ROS-Produktion der Hämozyten	
4.3 In vivo-Laborexposition mit Entenmuscheln	
4.3.1 <i>In vivo</i> -Versuche mit Referenzsubstanzen.	
4.3.1.1 Bioakkumulation von Schwermetallen	
4.3.2 In vivo-Versuche mit Abwasserproben	173
4.3.2.1 Biotestergebnisse der limnischen Biotestpalette	174
4.3.2.2 Immunmodulierende Effekte der In vivo-Abwasserversuche mit Anodonta and	atina 174
4.3.2.3 Fazit des Muschelexpositionsversuchs	177
4.3.2.4 Regeneration der Immunparameter nach erfolgter Exposition	177
4.3.2.5 Fehlerdiskussion der Abwasserversuche	179
4.3.3 Statistik der Expositionsmessparameter	180
4.4 In vivo-Frei(land)exposition mit Muscheln	
4.4.1 Schwankungen der Immunparameter im Jahresgang	182
4.4.2 Saisonale Korrelationen der Immunparameter in der Rheinwasserhälterung	182
4.4.3 Vergleich von Immunparametern zwischen Labor- und Rheinwasser-hälterung	184
4.4.4 Punktionsfolgen	185

4.5 Sensitivitätsvergleiche	186
4.5.1 Vitalität von Muschelhämozyten in vitro und nach In vivo-Expositionen von	
Entenmuscheln	187
4.5.2 Phagozytoseaktivität in vitro für Schwermetallverbindungen	189
4.5.3 Phagozytoseaktivität in vivo, in vitro und im Vergleich zum toxikologischen Endpukt für	
Mortalität von Mollusken	191
4.6 Mögliche Antwortmuster der funktionellen Immunparameter in vivo	193
4.7 Funktionelle Immuntoxizität	195
4.8 Ausblick	198
5 LITERATURVERZEICHNIS	.199
6 ANHANG	.210
6.1 Statistikanwendungen und -ergebnisse	210
6.1.1 Messparameter nach zweiwöchiger Abwasser- und Schwermetallexposition	. 210
6.1.2 Messparameter nach Regenerationsphase nach Abwasser-und Schwermetallexposition.	. 211
6.2 Statistik der Korrelationsanalysen	212

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ebenen der ökotoxikologischen Wirkungen und mögliche Dauer der Manifestation von	
Effekten in Abhängigkeit der Untersuchungsmethodik; verändert nach [2]	_ 20
Abb. 2: Wirkrichtungen der Ökotoxikologie	_ 22
Abb. 3: Modell der Immuntoxikologie aus [12]	_ 23
Abb. 4: Aufbau der Immunabwehr in Säugetierorganismen	_ 24
Abb. 5: Aktivierung des molekularen Sauerstoffs und Elektronenverteilung in den äußersten besetzten Molekülorbitalen, aus [56]	_ 30
Abb.6: Verwendete Detektionsebenen der Immunparameter	_ 36
Abb. 7: Schematische Darstellung des optischen Systems eines Durchflusszytometers aus [102]	_ 39
Abb. 8: Aussenansicht und Auswerteeinheit des verwendeten Durchflusszytometers	_ 40
Abb. 9: Messprinzip der Phagozytoseaktivität von Immunzellen	_ 40
Abb. 10: Testprinzip und Antwortmöglichkeiten der Phagozytoseaktivitätsmessung	_ 41
Abb.11: Stammbaum der Hämatopoese aus [103]	_ 44
Abb. 12 und 13: Mikroskopaufnahmen von P388 Zellen vor und nach Phagozytoseaktivität mit fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln	_ 49
Abb. 14 und 15: Anodonta anatina (links) und Anodonta cygnea (rechts)	_ 51
Abb. 16: Körpermaße von 83 Entenmuscheln aus Wielenbach	_ 54
Abb. 17: Korrelation von Volumen und Körpergewicht von 83 Entenmuscheln aus Wielenbach	_ 54
Abb. 18: Korrelation zwischen OD ₆₀₀ und Coulter-Counter Messungen für Desmodesmus subspicatus	_ 57
Abb.19 und 20: Versuchsaufbau der Muschelexpositionsversuche	_ 59
Abb. 21: Aufnahme von Desmodesmus subspicatus in der Zählkammer	_ 61
Abb. 22: Photo von Daphnia magna	_ 61
Abb. 23 und 24: Mikroskopische Aufnahmen von Vibrio fischeri	_ 61
Abb. 25: Muschelgewebehomogenate nach dem Kryomahlen	_ 65
Abb. 26: Entnahme von Hämolymphe aus dem vorderen Schließmuskel	_ 73
Abb. 27: 4-parametrisches logistisches Modell zur Berechnung von Konzentrations-	
Wirkungsbeziehungen	_ 80
Abb. 28: Strukturformel des Phenolrots	_ 82
Abb. 29: Absorptionsspektren und Extinktionszunahmen von Phenolrot durch unterschiedliche Wasserstoffperoxidkonzentrationen im Testansatz	_ 83
Abb. 30: Mikrotiterplattentestansatz der Phenolrotmethode in vitro unter Schwermetalleinfluss.	_ 87
Abb. 31: Wachstumsverlauf einer HL 60–Suspensionskultur über 14 d	_ 89
Abb. 32 und 33: Vorwärtsstreulicht (FSC) und Fluoreszenzintensität (FL3-H) von HL 60-Zellen nach Propidiumjodid-Färbung aus der logarithmischen Wachstums- (links) und aus der Stagnationsphase (rechts)	90
Abb. 34: Beispiel einer fluoreszenzmarkierten Latexpartikelaufnahme einer phagozytoseaktiven HL 60-Zelle, nach 4h Phagozytoseprozess	_ 90

Abb. 35,	36 und 37: Zunahme des Anteils an fluoreszenten Zellen durch Phagozytoseaktivität in Abhängikeit von der Versuchszeit	91
Abb. 38:	Fluoreszenzintensitäten von HL 60-Zellen nach 240-minütigem Phagozytoseprozess mit fluoreszierenden Latexpartikeln	_ 91
Abb. 39:	Lineare Korrelation der Messparameter Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE von HL 60-Zellen mit 95 %igen Konfidenzintervallen bei 37 °C	E) _ 93
Abb. 40	und 41: Zeitlicher Verlauf der Messparameter Phagozytoseanteil (links) und Phagozytose leistung (GE) (rechts) von HL 60-Zellen bei 37 °C	- _ 93
Abb. 42:	Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzzunahme von HL 60-Zellen durch Phagozytoseaktivität bei 37 °C	t _ 94
Abb. 43:	Einfluss unterschiedlicher Versuchstemperaturen auf den Phagozytoseanteil in Zeitabhängigkeit	95
Abb. 44	und 45: Punktionsvolumina (n=431) und vitale Hämozytendichten (n=388) von Enten- muscheln aus der Rheinwasserhälterung	96
Abb. 46:	Korrelation der Messergebnisse der Zellzahlbestimmungen nach Zählung in der Neubauer-zählkammer mit Trypanblaufärbung und Coulter Counter Messung (n=66)	97
Abb. 47:	Größenverhältnisse von granulären und agranulären Hämozyten nach mikroskopischer Messung von ca. 100 Hämozyten aus 4 verschiedenen Individuen	_ 97
Abb. 48-	52: Hämozyten aus Anodontenhämolymphe nach Pappenheim-Färbung	98
Abb. 53-	56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von granulären und agranulären Hämozyten nach 20 h Phagozytoseaktivität mit einer fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln	_ 98
Abb.57:	Beispiel einer Hämozytengrößenverteilung in Hämolymphe eine Stunde nach der Punktio durch Coulter-Counter-Messung	on _ 98
Abb. 58:	Intakter Schließmuskel vor der Punktion	99
Abb. 59:	Schließmuskel nach zweifacher Punktion	99
Abb. 60:	Schließmuskel nach dreifacher Punktion	99
Abb. 61:	Schließmuskel nach vierfacher Punktion	99
Abb. 62	und 63: Plattierungsversuch mit jeweils 100 µl Muskelabschabungssuspension vom vorderen Schließmuskel von Anodonta anatina	100
Abb. 64	und 65: Plattierungsversuch mit jeweils 100 µl Hämolymphe aus dem vorderen Schließmuskel von Anodonta anatina	100
Abb. 66:	Kontroll-Plattierungsversuch mit 100 µl Anodontenpuffer	100
Abb. 67:	Rückgang der vitalen Hämozytendichte mit zunehmender Standzeit	101
Abb. 68:	Rückgang der Phagozytoseleistung nach 6 d Standzeit der Hämolymphen	101
Abb. 69:	Regeneration der Phagozytoseleistung. Dargestellt sind 56 Phagozytoseleistungs- messungen von 11 Individuen nach einem Punktionsintervall von 3 Wochen	102
Abb. 70:	Regeneration der vitalen Hämozytendichten	102
Abb. 71:	Adhäsionsversuch mit Einzel- und Mischhämolymphe an Polystyrol und Polyethylen	103
Abb. 72:		
	Relativer Einfluss einer Veränderung der Hämozytenzahl gegenüber 50000 Hämozyten	104

Abb. 74:	Relativer Einfluss einer Veränderung des Serumanteils und des Beadanteils im 50000 Hämozytenansatz
Abb. 75 ι	und 76: Zeitlicher Verlauf der Messparameter Phagozytoseanteil und Phagozytose- leistung von Einzelhämolymphe bei 25 Grad Celsius aus der Laborhälterung untrypsiniert
Abb. 77:	Kinetikverläufe des Messparameters Anzahl der Ereignisse in Hämozytengröße von Einzelhämolymphe bei 25 °C aus der Laborhälterung untrypsiniert
Abb.78:	Einfluss der Hälterungswassertemperaturen auf die Phagozytoseleistung
Abb.79:	Formel der Q ₁₀ -Wert Berechnung
Abb. 80:	Einfluss der Hälterungswassertemperaturen auf den Phagozytoseanteil
Abb. 81 ι	und 82: Korrelation zwischen den Messparametern Phagozytoseanteil und Phagozytose- leistung (GE) zu den Zeitpunkten 1,2,4 und 6h, bei einer Hälterungstemperatur von 7,8 °C und 11,2 °C im Rheinwasser
Abb. 83 ເ	und 84: Korrelation zwischen den Messparametern Phagozytoseanteil und Phagozytose- leistung (GE) zu den Zeitpunkten 1,2,4 und 6h, bei einer Hälterungstemperatur von 15 °C im Labor und 21,2 °C im Rheinwasser
Abb. 85:	Korrelation zwischen den Messparametern Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) zu den Zeitpunkten 1,2,4 und 6h, bei verschiedenen Hälterungstemperaturen mit 95 %igen Konfidenzintervallen
Abb. 86:	Einfluss unterschiedlicher Versuchstemperaturen auf die Phagozytoseleistung von Mischhämolymphe aus Entenmuscheln unterschiedlicher Hälterungsbedingungen
Abb. 87:	Ergebnisse der Vitalitätsfärbungen von Mischhämolymphe mit Sytox-Green und Propidiumjodid (PJ) nach 20h Exposition von NiCl ₂
Abb. 88:	Dargestellt sind die E_{595} -Werte bei Zugabe unterschiedlicher H_2O_2 -Stoffmengen im Testansatz zwischen 0,55 µmol und 15 µmol mit 95 %igen Konfidenzintervallen
Abb. 89:	ROS-Produktionen von Mischhämolymphe in µmol H ₂ O ₂ -Radikaläquivalenten mit unterschiedlichen Hämozytenzahlen im Testansatz
Abb. 90:	Mittleren ROS-Produktionen von Mischhämolymphe in µmol H ₂ O ₂ -Radikaläquivalenten mit unterschiedlichen Hämozytenzahlen im Testansatz in den Zeitintervallen 0-4 h, 4-8 h, 8-12 h und 12-16 h
Abb. 91:	Relative Summen der ROS-Produktionen von Mischhämolymphe in den ersten 4 h mit unterschiedlichen Stimuli im Testansatz
Abb. 92:	Relativen Summen der ROS-Produktionen von Mischhämolymphe in den ersten 2 h mit unterschiedlichen Ethanol-Stimuli im Testansatz
Abb. 93:	ROS-Produktionen von 10 unterschiedlichen Einzelhämolymphen in µmol H ₂ O ₂ - Radikaläquivalente mit unterschiedlichen Hämozytenzahlen im Testansatz aus der Rheinwasserhälterung
Abb. 94 :	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von P388-Mausmakrophagen
Abb. 95:	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten
Abb. 96 ເ	und 97: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Methylquecksilberchlorid auf die Phagozytosaktivität von Muschelhämozyten

Abb. 98 bi	s 107: Dotplot und Histogrammdarstellung von Muschelhämozyten nach 20 h Inkubation mit Methylquecksilberchlorid1	24
Abb. 108:	Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung von Schwermetallen auf die Phagozytose- leistung von Muschelhämozyten1	25
Abb. 109:	Schwermetalleinfluss auf die ROS-Produktion von Mischhämolymphe 1	27
Abb. 110:	Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 42,5 μ g/l CH ₃ HgCl (1/100 der <i>in vitro</i> -LOEC)1	28
Abb. 111:	Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 4,25 μg/l CH ₃ HgCl (1/1000 der <i>in vitro</i> -LOEC)1	29
Abb. 112:	Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 0,425 μ g/l CH ₃ HgCl (1/10000 der <i>in vitro</i> -LOEC) 1	30
Abb. 113:	Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 6,14 mg/l NiCl ₂ (1/100 der <i>in vitro</i> - LOEC)1	31
Abb. 114:	Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 0,614 mg/l NiCl ₂ (1/1000 der <i>in vitro</i> -LOEC)	31
Abb. 115:	Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 61,4 μg/l NiCl ₂ (1/10000 der <i>in vitro</i> -LOEC)1	32
Abb. 116:	Phagozytoseleistungen von 2 unabhängigen Expositionsversuchen mit je 4 Entenmuscheln ohne Referenzsubstanz 1	33
Abb. 117:	Mittlere Quecksilberkonzentrationen und Bioakkumulationsfaktoren der Muschel- gewebe aus dem Expositionsversuch mit 42,5 μg/l CH ₃ HgCl 1	34
Abb. 118:	Mittlere Quecksilberkonzentrationen und Bioakkumulationsfaktoren der Muschel- gewebe aus dem Expositionsversuch mit 4,25 μg/l CH ₃ HgCl 1	34
Abb. 119:	Mittlere Quecksilberkonzentrationen und Bioakkumulationsfaktoren der Muschel- gewebe aus dem Expositionsversuch mit 0,425 μg/l CH ₃ HgCl 1	35
Abb. 120:	Zusammenhang zwischen Expositionskonzentration und Bioakkumulation nach 14 Tagen Expositionszeit für Methylquecksilberchlorid 1	35
Abb. 121:	Mittlere Nickelkonzentrationen und Bioakkumulationsfaktoren der Muschelgewebe aus den Expositionsversuchen mit Nickeldichlorid 1	36
Abb. 122:	Zusammenhang zwischen Expositionskonzentration und Bioakkumulation nach 7 Tagen Expositionszeit mit Nickeldichlorid 1	36
Abb. 123:	pT-Werte und niedrigste nichteffektive Verdünnungsstufen der limnischen Biotestpa- lette der Bundesanstalt für Gewässerkunde für die neutralisierten Abwasserproben 1	37
Abb. 124:	Phagozytoseleistungen der phagozytoseaktiven Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition1	38
Abb. 125:	Phagozytoseanteile der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition1	39
Abb. 126:	Phagozytoseleistungen der gesamten Hämozyten im Testansatz von Entenmuscheln na zweiwöchiger Abwasserexposition1	ch 39
Abb. 127:	ROS-Produktionen gemessen mit der Phenolrotmethode in den ersten 90 min in H ₂ O ₂ - Radikaläquivalenten der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition1	40

Vitale Hämozytendichten nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauer- kammer von Hämozyten aus Entenmuscheln direkt nach der Punktion nach zweiwöchig Abwasserexposition	er 140
Nekrotische Hämozytenanteile nach dem Phagozytoseansatz der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition	141
Phagozytoseleistungen der phagozytoseaktiven Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerations-phase	142
Phagozytoseanteile der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase	143
Phagozytoseleistungen der bezogen auf die Gesamthämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase	143
ROS-Produktionen gemessen mit der Phenolrotmethode in den ersten 90 min in H ₂ O ₂ - Radikaläquivalenten der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase	144
Vitale Hämozytendichten nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkamme von Hämozyten aus Entenmuscheln direkt nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase	r 144
Nekrotische Hämozytenanteile nach dem Phagozytoseansatz von Hämozyten aus Entenmuscheln direkt nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase	145
Temperaturverlauf der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung (n=52)	146
Leitfähigkeitsverlauf der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung (n=52)	146
Sauerstoffgehalt und pH-Werte der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung (n=52)	147
Mittlerer Gesamtchlorophyllgehalt in µg/l der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung (n=52)	148
Mittlerer Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) von Hämozyten der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung	148
Mittlere vitale Hämozytenzahlen nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer von Hämozyten der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung	149
Korrelation zwischen Wasserhälterungstemperatur und mittlerer Phagozytoseleistung (aus n = 49) für die KW 13-27 mit 95 %igen Konfidenzintervallen	150
Korrelation zwischen Wasserhälterungs-temperatur und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus n = 49) nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer für die KW 13-27 mit 95 %igen Konfidenzintervallen	150
Korrelation zwischen mittlerer Phagozytoseleistung (aus n=49) und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus n=49) nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauer- kammer für die KW 13-27 mit 95 %igen Konfidenzintervallen	150
Korrelation zwischen Wasserhälterungstemperatur und mittlerer Phagozytoseleistung (aus n = 48) für die KW 29-41 mit 95 %igen Konfidenzintervallen	151
Korrelation zwischen Wasserhälterungs-temperatur und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus n = 48) nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer für die KW 29-41 mit 95 %igen Konfidenzintervallen	151
	Vitale Hamozytenichten nach Trypanblaufarbung und Zahlung in der Neubauer- kammer von Hämozyten aus Entenmuscheln direkt nach der Punktion nach zweiwöchig Abwasserexposition

Abb. 147:	Korrelation zwischen mittlerer Phagozytoseleistung (aus n = 48) und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus n = 48) nachTrypanblaufärbung und Zählung in der Neubauer- kammer für die KW 29-41 mit 95 %igen Konfidenzintervallen	151
Abb. 148:	Korrelation zwischen Wasserhälterungstemperatur und mittlerer Phagozytoseleistung (aus n = 55) für die KW 43-51 mit 95 %igen Konfidenzintervallen	152
Abb. 149:	Korrelation zwischen Wasserhälterungs-temperatur und mittlerer vitaler Hämozyten- zahl (aus n = 55) nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer für die KW 43-51 mit 95 %igen Konfidenzintervallen	152
Abb. 150:	Korrelation zwischen mittlerer Phagozytoseleistung (aus n=55)und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus n=55) nachTrypanblaufärbung und Zählung in der Neubauer- kammer für die KW 43-51 mit 95 %igen Konfidenzintervallen	152
Abb. 151:	Mittlere Phagozytoseleistungen der Phagozytosemessungen aus der Laborhälterung gegenüber der Rheinwasserhälterung im Jahresverlauf 2006	153
Abb. 152:	Mittlere vitale Hämozytendichten nach Trypanblaufärbung und Neubauerzählung aus der Laborhälterung gegenüber der Rheinwasserhälterung im Jahresverlauf 2006	154
Abb. 153:	Verwendete Detektionsebenen der Immunparameter	155
Abb. 154:	Darstellung der erfassten Messparameter nach der Muschelexposition mit den Abwasserproben	175
Abb. 155:	Immunmodulierendes Potential der verdünnten Abwasserproben	177
Abb. 156:	Prozentuale relative Veränderung der mittleren Phagozytosemessparameter nach der Expositionsphase und anschließender Regenerationsphase, bezogen auf die Negativkontrolle nach der Exposition	178
Abb. 157:	Variationskoeffizienten der Messparameter im Abwasserexpositionsansatz	179
Abb. 158:	Einflussgrößen auf das Immunsystem, verändert nach [75]	181
Abb. 159:	Korrelationsergebnisse für unterschiedliche Temperaturbereiche der Rheinwasser- hälterung	182
Abb. 160:	Sensitivitätsmuster der Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten und P388- Mausmakrophagen gegenüber Schwermetallverbindungen	189
Abb. 161:	Empfindlichkeitsvergleich <i>in vivo-</i> und <i>in vitro-</i> Versuche für Phagozytoseaktivität mit anderen Mollusca-Biotestergebnissen (EC ₅₀ -Werte der Mortalität) der US-EPA für Nickeldichlorid, Quecksilberdichlorid und Methylquecksilberchlorid	192
Abb. 162:	Modell der Antwortmuster der funktionellen Immunparameter aus den <i>In vivo</i> - Expositionsversuchen	194

Tabellenverzeichnis

Tab.	1:	Immunologische Veränderungen oder kompensatorische Veränderungen nach Exposition	
		von Immuntoxinen, verändert nach [15]	_ 25
Tab.	2:	Enzymatische Schutzsysteme gegen reaktive Sauerstoffspezies, aus [56]	31
Tab.	3:	Xenobiotika mit immunmodulativen Wirkungen auf Muscheln oder deren Hämozyten	_ 33
Tab.	4:	Grundeinstellungen für die Messung von HL 60-Zellen mit Propidiumjodid	47
Tab.	5:	Unterscheidungsmerkmale von Anodonta anatina und Anodonta cygnea	52
Tab.	6:	Expositionsbedingungen der Referenzsubstanztestungen	60
Tab.	7:	Chemisch physikalische Messparameter der Abwasserrpoben vor und nach den	
		Probenbehandlungen für die Bioteste	62
Tab.	8:	Grundeinstellungen für die Messung von Phagozytoseaktivität und Vitalität von	
		Muschelhämozyten	82
Tab.	9:	Zusammensetzung des Testansatzes der ROS-Messung von Anodontenhämozyten	84
Tab.	10	Zusammensetzung der Testansätze der Kalibrationsmessungen mit H ₂ O ₂	85
Tab.	11:	Zusammensetzung der Testansätze der Stimuliversuche	86
Tab.	12:	Zusammensetzung der Testansätze der Schwermetallversuche	86
Tab.	13	Versuchsbedingungen unterschiedlicher Immunzellen im Phagozytoseansatz	113
Tab.	14:	EC ₅₀ -Werte für Schwermetallverbindungen auf die Phagozytoseleistung (GE) von P388-	
		Mausmakrophagen nach Regression mit einem 4-parametrischen logistischen Modell $_$	121
Tab.	15	EC ₅₀ -Werte für Schwermetallverbindungen auf die Phagozytoseleistung (GE) von	
		Muschelhämozyten nach Regression mit einem 4-parametrischen logistischen Modell $_$	122
Tab.	16	Sensitivitätsspektrum der Phagozytoseleistung (GE) von Muschelhämozyten gegenüber	
		ausgewählten Umweltchemikalien	126
Tab.	17:	Speziesbedingte EC ₅₀ -Werte von Schwermetallen der <i>in vitro-</i> Phagozytoseaktivität von	
		Muschelhämozyten. Vergleichswerte wurden aus [78] entnommen, Angaben in mol/l	
		Probenkonzentration	162
Tab.	18:	Speziesbedingte EC ₅₀ -Werte der <i>in vitro</i> -Phagozytoseaktivität von Blutzellen nach	
		Methylquecksilberchlorid-Exposition, verändert nach [129].	190
Tab.	19:	Standardtoxizitätsstudien der Industrie zur Erfassung immuntoxischer Effekte von	
		humanen Pharmazeutika, aus [131]	196
Tab	20:	Mann-Whitney-U-Testergebnisse des Einzelwertvergleichs der Messparameter der	
		Abwasser- und Schwermetallexposition von Entenmuscheln	210
Tab.	21:	Mann-Whitney-U-Testergebnisse des Einzelwertvergleichs zwischen den Messwerten	
		nach der Regenerations- und Expositionsphase der Entenmuscheln	211
Tab.	22	Prüfung des Korrelationskoeffizienten r auf Signifikanz gegen Null, aus [115]	212

Vorwort

Die Daten dieser Dissertation wurden im Rahmen eines Forschungsprojektes vom Umweltbundesamt (UFO-Plan 2004, FKZ: 20322384) an der Bundesanstalt für Gewässerkunde erhoben.

Titel des Forschungsprojektes

"Unterstützung für aquatische Tests im Rahmen der Normung:

Erfassung immuntoxischer Effekte/Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten"

Die Projektleitung hatte Herr Dr. Georg Reifferscheid

Während des Forschungsprojektes fand eine Koordination der Untersuchungen und ein Methodentransfer mit dem Umweltbundesamt (UBA) Fachgebiet III 3.4, Schichauweg 58 in 12307 Berlin statt. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich für die freundliche und inhaltliche Unterstützung sowie für die Diskussionsbereitschaft von Herrn Dr. Hans-Jürgen Pluta und Frau Monika Pattard bedanken. Ebenfalls danken möchte ich Frau Martina Gutsche, für Ihre Bemühungen, die Methoden trotz messtechnischer Probleme zu etablieren.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen danken, die direkt oder indirekt an der Dissertation mitgewirkt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Georg Reifferscheid für die Möglichkeit, die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe "Spezielle Ökotoxikologie" anzufertigen; für sein Vertrauen in meine Fähigkeiten und seine kritischen Anmerkungen in der Entstehungsphase dieser Dissertation. Durch seinen Einsatz für eine Projektdehnung war es mir möglich weiteren Fragestellungen nachzugehen.

Herrn PD Dr. Werner Manz danke ich für seine Impulse, zusätzliche Qualifikationen und Schlüsselfertigkeiten an mir zu erarbeiten und für seine sachlichen Anmerkungen und menschlichen Ratschläge.

Herzlichen Dank auch Herrn Prof. Dr. Thomas Braunbeck für sein Interesse und seine kritischen, aber auch hilfreichen Anmerkungen sowie die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit. Dem gesamten Referat für Ökotoxikologie/Biochemie der Bundesanstalt für Gewässerkunde für seine freundliche und kollegiale Unterstützung sowie der Offenheit sich auch mit sehr speziellen Forschungsfragen auseinanderzusetzen.

Im besonderen aber Herrn Dr. Falk Krebs für seine gutgemeinten Ratschläge und seine stetigen Bemühungen, mich neben den Naturwissenschaften auch für geschichtliche und kulturelle Aspekte des Lebens zu sensibilisieren. Herrn Steffen Wahrendorf, Frau IIona Kirchesch, Frau Angela Koppers und Frau Stefanie Wunsch für Ihre freundliche Unterstützung bei Vergleichstestungen mit der limnischen Biotestpalette.

Frau Denise Spira für Ihren Einsatz bei den Zellkulturtestungen, die für einen bestimmte Zeit nicht so reagierten, wie wir es erwarteten. Frau Stephanie Schönberger und Herrn Christian Sodemann für ihre Hilfe bei der Fortsetzung der Expositionsversuche und ihre Lernbereitschaft.

Den Kollegen Herrn Manfred Sturm und Herrn Bernhard Welling aus dem Referat für Gewässerchemie für den Einsatz Ihres Wissens und Ihrer Fähigkeiten bei den Abwasseranalysen und der Optimierung der Bestimmungsmethoden für Biota in den Bioakkumulationsversuchen mit Teichmuscheln.

Frau Dorothea Maria Selke und Herrn Dr. Hans-Dieter Stock vom LANUV-NRW für die Bereitstellung der interessanten Abwasserproben und Frau Dr. Marianne Engels für Ihre hämatologischen Kenntnisse und ihr Interesse für nicht humane Blutzellen.

Herrn Alexander Thieme-Garmann und Herrn Bernd Uebelmann für ihre sprachlichen Fähigkeiten, die mir bei Auseinandersetzungen mit der deutschen und der englischen Sprache sehr hilfreich waren.

Dank auch meiner Lebensgefährtin Karin Bergmann für ihr Verständnis für meine körperliche Abwesenheit an Abenden und Wochenenden und für meine geistige Abwesenheit, wenn mich experimentelle Probleme plagten. Besonders danken möchte ich ihr für unsere beiden biologischen Wunder Clara und Laura, denen ich diese Arbeit widmen möchte.

Koblenz, im Oktober 2007

Abkürzungen

ΔbwV	Abwasserverordnung
BfG	Rundesanstalt für Gewässerkunde
BGB	Bundesgesetzbuch
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
DHS	Donor Horse Serum
DIN	Deutsches Institut für Normung
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DMSO	Dimethylsulfoxid
FC	Effect Concentration
FDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol
EPA	Environmental Protection Agency
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocvanat
FKZ	Förderkennzeichen
FSC	Forward Scatter
GE	Gesamtereignis
IKSR	Internationale Kommission zum Schutz des Rheins
ISO	International Organization for Standardization
KW	Kalenderwoche
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
MG	Molekulargewicht
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NE	Negativereignis
NK	Negativkontrolle
NOEC	No Observed Effect Concentration
PAK	Polyaromatischer Kohlenwasserstoff
РСВ	Polychlorierte Biphenyle
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Positivereignis
PJ	Propidiumjodid
PK	Positivkontrolle
PS	Polystyrol
RA	Retinoic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SOP	Standard Operating Procedure
SSC	Side Scatter
ТРА	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (auch PMA genannt)
UBA	Umweltbundesamt
U/min	Umdrehungen pro min
VF	Verdünnungsfaktor
Vk	Variationskoeffizient
WHG	Wasserhaushaltsgesetz
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie

Zusammenfassung

Gegenstand der Untersuchung

In der vorliegenden Arbeit wurden Grundlagen zur Beurteilung des Immunstatus von Muscheln als Indikatororganismen in aquatischen Ökosystemen und zur Entwicklung eines Testverfahrens auf Immuntoxizität für den Süßwasserbereich erarbeitet.

Methodik

Als primäre immuntoxikologische Endpunkte wurden die Modulationen der Phagozytoseaktivität sowie der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) *in vitro* und *in vivo* mit Muscheln der Art *Anodonta anatina* (Entenmuschel) untersucht. Sekundäre Endpunkte waren die Vitalität der Hämozyten und Veränderungen der vitalen Hämozytendichte. Zur Erfassung der Messparameter wurden durchflusszytometrsiche, photometrische sowie fluorimetrische Methoden etabliert und validiert.

Ergebnisse

Mit *In vitro*-Screening-Testungen wurden unter Verwendung von Muschelhämozyten Schwermetallverbindungen, PAKs, PCBs und Pharmazeutika auf ihre akut immuntoxische Wirkung getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Muschelhämozyten ein vergleichbares Sensitivitätsmuster gegenüber Schwermetallverbindungen wie Mausmakrophagen (P388-Zellen) aufweisen. Die Hemmwirkung durch verschiedene Schwermetalle kann jedoch um mehrere Zehnerpotenzen in den EC₅₀-Werten dieser beiden Testsysteme abweichen, was den Bedarf an einer integralen Erfassung dieser Wirkungen durch Biotests verdeutlicht. Auf der *In vitro*-Ebene kam es zu Überlagerungen von zytotoxischen und immuntoxischen Effekten.

Für *In vivo*-Testungen wurden Expositionsbedingungen mit Anodonten ermittelt, in denen subletale immunmodulierende Effekte für die Messparameter Phagozytoseaktivität und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies auftraten und subchronische Effekte auf den Immunstatus anzeigten. Die *In vivo*-Expositionen in der Laborhälterung erfolgten mit dotiertem Hälterungswasser sowie belasteten Abwasserproben aus kommunalen und industriellen Kläranlagen. Zusätzlich wurden die Messparameter der Phagozytoseaktivität und der vitalen Hämozytendichte von Entenmuscheln in einer Rheinwasserexposition im Jahresgang 2006 erfasst. Die Immunparameter konnten partiell mit dem Temperaturverlauf korreliert werden.

Die verwendeten *In vitro-* und *In vivo-*Teststrategien weisen erhebliche Sensitivitätsunterschiede auf, die für getestete Schwermetallverbindungen mehr als drei Zehnerpotenzen in der Konzentration auseinander liegen. Die Empfindlichkeit der Immunparameter (Phagozytoseaktivitität und ROS-Produktion) der *In vivo-*Laborexposition von Entenmuscheln ist auch signifikant größer, im Vergleich zu klassischen ökotoxikologischen Endpunkten für Mortalität anderer Muschelarten und der limnischen Biotestpalette für Abwasserbewertungen (Algen, Daphnien-, und Leuchtbakterientest).

Schlussfolgerungen

Es konnte ein sensitives Instrument zur Erfassung subletaler immuntoxischer Effekte erarbeitet werden, welches hinsichtlich seiner Praktikabilität weiter evaluiert werden muss. Die zentrale Rolle der Phagozytose in der Immunabwehr und ihre Sensitivität als biologische Funktion für umweltrelevante Xenobiotika in unterschiedlichen Spezies erlauben funktionelle immunmodulierende Potenziale für aquatische Systeme abzubilden, die stellvertretend für ein weites Organismenspektrum stehen.

Summary

Subject of the study

The subject of this study was the development of basic methods for the assessment of the immune status of mussels in aquatic ecosystems and for the development of a test procedure for immunotoxicity in freshwater.

Methods

The primary immunotoxicological endpoints examined were the modulations of phagocytosis activity and the production of reactive oxygen species (ROS) *in vitro* and *in vivo* in mussels of the species *Anodonata anatina* (duck mussels). Secondary endpoints were the viability of haemocytes and variations in the vital density of haemocytes. For the measurement of the parameters flow-cytometric, photometric and fluorimetric methods were established and validated.

Results

Heavy metal compounds, PAHs, PCBs, and pharmaceuticals were tested by *in vitro* screening for their acute immunotoxic effects. It could be shown that mussel haemocytes have a similar sensitivity pattern against heavy metal compounds as mouse macrophages (P388 cells). However, the inhibitory effect of several heavy metals may deviate by several orders of magnitude in the EC_{50} values in these two test systems, thus illustrating the need for an integrative detection of such effects with bioassays. In the *in vitro*-tests, a mutual interference of cytotoxic and immunotoxic effects was observed.

For the *in vivo* tests, conditions for the exposure of the duck mussels were used, under which sublethal immune-modulating effects of the parameters phagocytosis activity and production of reactive oxygen species (ROS) occurred and indicated subchronic effects on the immune status. Under laboratory conditions, the mussels were exposed to spiked water and to contaminated wastewater samples from municipal and industrial treatment plants.

Supplementary, the parameters "phagocytosis activity" and "vital haemocyte density" of duck mussels kept in water from the River Rhine were measured over the whole year 2006. Partially, correlations with the course of temperature variations could be found.

The applied *in vitro*- and *in vivo*-test strategies differed significantly in sensitivity. The concentration values of the tested heavy metals were more than three orders of magnitude lower than in the *in vitro*-systems. The sensitivity of the immunoparameters (phagocytosis activity and ROS-production) of duck mussels under *in vivo* laboratory exposure is significantly greater than classical ecotoxicological endpoints for mortality of other mussel species and those of the battery of limnic bioassays used for wastewater assessment (algae, daphnia, and luminescent-bacteria tests).

Conclusions

A sensitive instrument for the detection of sublethal immunotoxic effects was successfully developed, although further improvements are necessary regarding its practicability and validation. The central role of phagocytosis in immune defense and the sensitivity of this biological function to environmental xenobiotics in several species make them suitable to indicate immune-modulating potentials in aquatic systems. These detected functional immunomodulations could be representative for a wide range of organisms.

1 Einleitung

1.1 Ökotoxikologie als multidisziplinäre Wissenschaft

1.1.1 Ökotoxikologie und die ökotoxikologischen Wirkungsebenen

Die Ökotoxikologie untersucht die Effekte von Chemikalien im Zusammenhang mit der Exposition und dem Verhalten der Stoffe in der Umwelt; dabei vernetzt sie Umweltchemie, Toxikologie und Ökologie. Ökotoxikologische Untersuchungen befassen sich im engeren Sinn mit den Wirkungen von Chemikalien auf allen biologischen Ebenen, vom Molekül bis zum Ökosystem [1]. Das ist nur eine von zahlreichen Definitionen der Ökotoxikologie, die sich aus einer Subdisziplin der Umweltchemie und der Toxikologie in den letzten Jahrzehnten zu einem selbständigen Wissenschaftszweig entwickelt hat, der mehrere multidisziplinäre Qualitäten mitbringt. Die Wirkung anthropogener Schadstoffe, die Einfluss auf verschiedene ökologische Organisationsebenen nehmen können, wird zunehmend differenzierter sichtbar. Die Zeitspanne bis zur Manifestation von ökotoxikologischen Wirkungen ist von dem Testsystem und dessen Organisationsebene abhängig (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Ebenen der ökotoxikologischen Wirkungen und mögliche Dauer der Manifestation von Effekten in Abhängigkeit der Untersuchungsmethodik; verändert nach [2].

Ein ökotoxikologisches Testergebnis besitzt nur eine eindeutige Relevanz für die Ebene, auf der es untersucht wurde, aber es gibt starke Bestrebungen, valide Testverfahren mit Zellkulturen oder auf noch niedrigerer Organisationsebene einzusetzen, um Aussagen über subletale und letale ökotoxikologische Potenziale unterschiedlicher Wirkrichtungen treffen zu können. Aspekte der Praktikabilität, des Tierschutzes und auch der Standardisierbarkeit sprechen für den Einsatz solcher Verfahren, doch muss sich ihre Sensitivität und die Bandbreite für Schadstoffwirkungen gegenüber der Sensitivität und der höheren Relevanz organismischer Testverfahren behaupten können. Da es nicht möglich ist, den gesamten Umfang potenzieller Schadstoffwirkungen auf allen Ebenen zu erfassen, ist es notwendig, zuverlässige Testsysteme unterschiedlicher Trophieund Organisationsstufen zu wählen, die integrativ Schadstoffwirkungen anzeigen können. Dabei ist es sinnvoll, Methoden für Testorganismen zu entwickeln, die von besonderer ökologischer Relevanz sind und ebenfalls Zielstrukturen und Zielmechanismen für Schadstoffwirkungen aufweisen, die auch für ein breites Organismenspektrum stellvertretend stehen können, um ökotoxikologische Potenztiale abzubilden.

1.1.2 Der chemisch numerische und der ökotoxikologische Ansatz zur Erfassung von Belastungen

Eine chemische Analyse gibt Aufschluss über die stoffliche Natur einer Belastung. Ihre Aussagekraft bleibt auf die gemessenen Parameter beschränkt. Aus einer Unzahl von Probeninhaltsstoffe kann nur ein kleiner Teil gemessen werden [3]. Es muss berücksichtigt werden, dass ein toxikologisches Potenzial nur bei ausreichender Kenntnis der Schadstoffe sowie deren gegenseitiger Beeinflussung abgeschätzt werden kann. Aufgrund der stofflichen Vielfalt der Xenobiotica und deren vielfältige Wirkungsrichtungen (siehe Abb. 2 in Kap. 1.1.3) ist eine Erweiterung des chemisch numerischen Ansatzes um eine ökotoxikologische Gefahrenpotenzialabschätzung unausweichlich. Die ökotoxische Wirkung eines Stoffes ist abhängig von seinen chemisch-physikalischen Eigenschaften, seiner Dosis, der Expositionsdauer sowie seiner Aktivität und Bioverfügbarkeit. Die Vielfältigkeit und Komplexität der Faktoren, die die Bioverfügbarkeit beeinflüssen können verdeutlicht, dass die Bioverfügbarkeit immer nur im Rahmen des jeweiligen Lebensraumes eine Bedeutung besitzt und organismenspezifisch stark variieren kann. In den Fällen, in denen ein Stoff bioverfügbar ist, kann eine Aufnahme durch Organismen erfolgen. Es kommt zu einer Interaktion mit Rezeptorstellen, welche im Prinzip eine messbare biochemische oder biologische Reaktion bewirken. Diese Reaktion kann über entsprechende Testorganismen in Biotests geprüft werden. Eine Erfassung der Faktoren, die die Bioverfügbarkeit bedingen, ist für eine Wirkungsbeurteilung der Schadstoffe und der Testsysteme wünschenswert. Neben den akuten Wirkungen von Schadstoffen sind dabei auch chronische und subchronische Wirkungen zu berücksichtigen.

1.1.3 Bedeutung der biologischen Wirkungstests und Wirkrichtungen

Biotests sind biologische Testverfahren, bei denen Organismen in definierter Art und Anzahl eingesetzt werden, um deren Reaktion auf eine Exposition zu messen [1]. Mit biologischen Testverfahren können sowohl ökotoxikologische Wirkungen von Einzelstoffen als auch Kombinationswirkungen (agonistische, antagonistische, additive, synergistische, inhibitorische, kompetitive, usw.) aller vorhandenen Kontaminanten erfasst werden. Diese integrale Erfassung von Schadstoffwirkungen macht die ökotoxikologische Untersuchung als Entscheidungshilfe für ein Umweltmanagment unentbehrlich [3]. Biologische Verfahren können die analytisch nicht erfassten oder nicht erfassbaren Schadstoffe anhand ihrer Schadstoffwirkung (wirkungsorientierte Analytik, siehe Abb.2) anzeigen, sie ermöglichen aber in der Regel keinen qualitativen oder quantitativen Stoffnachweis. Es können auch Kompartimente dieser Organismen, Zellkulturen, entsprechende Biomarker oder Bioindikatoren für die Er-

fassung dieser Reaktionen eingesetzt werden. Gerade die suborganismischen Testsysteme haben in den vergangenen Jahrzehnten einen immer höheren Stellenwert bei der Beurteilung der spezifischen Wirkrichtungen erfahren [4]. Diese spezifischen toxischen Wirkungen "neueren Interesses" umfassen, z.B. Gentoxizität, hormonaktive Wirkungen und immuntoxische Wirkungen und lassen sich mit den herkömmlichen ökotoxikologischen Bewertungskriterien (Mortalität, Wachstumshemmung, Verlust von Schwimmfähigkeit oder anderen stoffwechselphysiologischen Parametern) nicht beschreiben. Der Begriff unerwünschte oder "neuartige Wirkungen" bezieht sich daher nicht auf die Neuartigkeit dieser Wirkungen, sondern es haben sich in den letzten Jahrzehnten erst Methoden etabliert, die einen Teil dieser spezifischen toxischen Wirkungen abbilden können [5] [6].



Abb. 2: Wirkrichtungen der Ökotoxikologie

Mittlerweile gibt es eine Reihe von genormten Testverfahren, die gentoxische und mutagene Wirkungen anzeigen können [7] [8] [9]; leider ist dies für hormonaktive und immuntoxische Wirkungen nicht der Fall. Es mehren sich zwar die Erkenntnisse, dass auch immuntoxische Effekte in der aquatischen Umwelt immer häufiger nachgewiesen werden können und ein ökotoxikologisches Potenzial besteht, doch fehlt es an validen Methoden, das Ausmaß dieser Wirkungen organismenübergreifend zu bestimmen. Im marinen Umweltbereich sind die Forschungsaktivitäten wesentlich ausgeprägter, was sich auch in der Anwendung und Verfügbarkeit von Methoden (siehe Kap. 1.2.5) zur Erfassung von immuntoxischen Effekten widerspiegelt.

Das Kapitel 1.1 wurde aufgrund seines engen thematischen Bezuges zu Teilen aus [10] entnommen, dort sind auch weitere Informationen zu Nachweismöglichkeiten der hormonaktiven und gentoxischen Wirkungen zu finden.

1.2 Immunstatus und aquatische Immuntoxikologie mit Muscheln

1.2.1 Immunstatus von Organismen und Immuntoxikolgie

Zum Schutz vor Infektionen besitzen Organismen ein funktionstüchtiges und vielschichtiges Abwehrsystem, das Krankheitserreger und körperfremde Stoffe oder auch entartete körpereigene Zellen erkennt und bekämpft. Es handelt sich um das Immunsystem. Generell lassen sich zwei Antwortrichtungen des Immunsystems unterscheiden: Eine Immunsuppression führt zu einer Herabsetzung der natürlichen Resistenz gegenüber opportunistischen Pathogenen wie Viren, Pilze und Bakterien, aber auch zu einer verminderten Sensitivität gegenüber Tumorzellen und fremdem Zellmaterial. Eine Überaktivierung oder Immunostimulation der Immunleistungen kann zu Schädigungen eigener Zellen führen und vielfältige Autoimmunerkrankungen und Allergien, d.h. hypersensible Immunreaktionen auf Allergene hervorrufen.

Die wichtigsten Wege zu einer Autoimmunerkrankung können durch das Durchbrechen von anatomischen und biochemischen Barrieren, die Schädigung körpereigener Gewebe und Zellen sowie die Bindung fremder Haptene an körpereigene Trägerproteine sein [11]. Diese Haptene können kleine organische Moleküle sein und stören die Eigenerkennung des Immunsystems als nicht immunogene Antigene, was zu immunlogischen Reaktionen führt. Auch wird ein erhöhtes Krebsrisiko, z.B. durch die dauerhafte Induktion von zelleigenem oxidativen Stress, mit einer Immunüberreaktion assoziiert. Die Beeinflussung des Immunstatus durch sogenannte Modulatoren kann gut durch ein Modell der Immuntoxikologie beschrieben werden (siehe Abb. 3). Dabei kann ein Modulator ein Antigen, d. h. jedes Molekül, das von den erworbenen Bestandteilen des Immunsystems erkannt wird, eine Umweltchemikalie, ein physikalischer Umweltfaktor oder eine physiologische Reaktion in einem Organsystem sein, die z.B. auch psychogen bedingt sein kann [12].



Abb. 3: Modell der Immuntoxikologie aus [12]

Durch die strukturelle und organisatorische Komplexität und Variabilität des Immunsystems mit seinen verschiedenen Funktionen sind die Wirkungen von Umweltbedingungen und Umweltchemikalien schwer vorherzusagen, da meist verschiedene Modulatoren zusammenwirken und sich gegenseitig beeinflussen können. Bei der Vielzahl der Beeinflussungsmöglichkeiten des Immunsystems wird klar, dass eine realistische Bewertung von immuntoxischen Effekten nur auf einer Batterie von Testverfahren mit verschiedenen immunologischen Endpunkten beruhen kann [13]. Die Verwendung von mehreren immuntoxikologisch relevanten Endpunkten minimiert das Risiko falsch negativer oder positiver Aussagen über immuntoxische Wirkungen in Organismen.

Der Begriff Immuntoxikologie bekommt eine duale Bedeutung, da er einerseits die Schädigung des Immunsystems, seiner Organe und Zellen, andererseits aber auch die Schädigung des Organismus nach erfolgter Dysregulation des Immunsystems untersucht [14]. Diese Störungsmöglichkeiten des Immunsystems besitzen erheblichen Einfluss auf die Funktionen des zellulären und des humoralen (an die Körperpflüssigkeit gebundenen) Immunsystems, wobei die Immuntoxikolgie sich verstärkt auf die erworbenen und weniger auf die angeborenen Dysregulationen des Immunsystems konzentriert. Da das Immunsystem von Vertebraten, insbesondere das von Säugetieren, eine hohe funktionelle und strukturelle Komplexizität aufweist, das auch in Verbindung mit dem neuroendokrinen System steht, soll an dieser Stelle kurz auf die Vielschichtigkeit der Immunabwehr eingegangen werden (siehe Abb. 4), ohne dass dafür notwendige Organsystem darzustellen.



Abb. 4: Aufbau der Immunabwehr in Säugetierorganismen

Das Immunsystem ist essentiell für das längerfristige Überleben von Organismen. Seine Komplexität ist derzeitig nur teilweise verstanden, gleichsam bilden spezifische und unspezifische Immunfunktionen eine ausschlaggebende Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase und Immunregulation [15]. Im Immunsystem gibt es humorale und zelluläre Mechanismen, die untereinander unter Primär- und Sekundärantworten sowie durch vielfältige Botenstoffe in Kontakt stehen. Die Granulozyten stellen mehr als 60% der im menschlichen Blut

zirkulierenden Leukozyten dar und sind neben der Haut als erste Barriere des zellulären Immunsystems zu verstehen. Granulozyten sind bei bakteriellen Infektionen als schnellste Zellen durch eine ausgeprägte Chemotaxis vor Ort [14]. Zusammen mit den Monozyten und Makrophagen sind sie zur Phagozytose, d.h. zur Aufnahme partikulären Materials befähigt. Neben diesem intrazellulären Verteidigungsmechanismus sind Granulozyten, Monozyten und Makrophagen auch zu extrazellulären Verteidigungsaufgaben durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS-Produktion, oxidative Burst) in der Lage (siehe Kap. 1.2.4.2). Die Vielfältigkeit anderer Immunfunktionen und deren gegenseitige Beeinflussung sollte bei einer immuntoxikologischen Bewertung berücksichtigt werden (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Immunologische Veränderungen oder kompensatorische Veränderungen nach Exposition von Immuntoxinen, verändert nach [15]:

Veränderungen durch immuntoxische Wirkungen		
Verlust oder Induktion von Zellpopulationen		
Beeinträchtigung von Zellfunktionen und Zelldifferenzierungen		
Veränderung des Zellstoffwechsels		
Membranschädigungen		
Verlust von Membranrezeptoren		
Veränderte Zelloberflächen,		
z.B. Antigenexpression und Expression von sequestrierten Antigenen		
Veränderte Zytokinproduktion oder Beinträchtigung des Transports und der Sekretion von		
Zytokinen		
Beeinträchtigte Proteinsynthese		
Veränderte Apoptose		
Veränderung des oxidativen Stresslevels		
Veränderungen der Phagozytoseaktivität		
Veränderungen der humoralen Aktivität		
Haptenformation		

Wichtige Ansatzpunkte für eine Verständnisentwicklung des Immunstatus diverser Organismen, sind daher wirkungsbezogene Testverfahren für elementare, evolutionär hoch konservierte Funktionsweisen zu erarbeiten, um Einblick in ökotoxikologische Zusammenhänge höherer Relevanz zu erhalten. Daher sind die intrazellulären und extrazellulären Verteidungsfunktionen durch Phagozytose und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die sowohl bei Invertebraten und Vertebraten angeboren (zumindest im nicht durch Antikörper vermittelten Anteil) und relativ unspezifisch vorkommen, bei einem ökotoxikolgischen Ansatz zu bevorzugen. Da diese Immunfunktionen phylogenetisch recht alt sind, ist anzunehmen, dass modulative Wirkungen auf diese Immunparameter für viele Organismen eine gemeinsame ökologische Relevanz besitzen können.

1.2.2 Muscheln als Modellorganismen für die aquatische Toxikologie

Muscheln wurden in der Vergangenheit extensiv als biologische Indikatoren für Umweltverschmutzungen in Monitorprogrammen benutzt [16]. Die Gründe für diese Wahl liegen in ihrer weiten geographischen Verbreitung, der mehr oder weniger ausgeprägten Sessilität der Organismen, ihren hohen Filtrationsleistungen und dem hohen bioakkumulativen Potenzial für eine Vielzahl an Umweltchemikalien [17]. So können z.B. Veränderungen in Entgiftungssystemen wie dem P450-Enzymsystem [18] oder die Aktivierung von Metallothioneinen [19] [20] teilweise Aufschluss über den Belastungszustand der Organismen oder Zellen bieten. Auch wenn das P450-Entgiftungssystem in Muscheln im Vergleich zu Wirbeltieren vergleichsweise schwach ausgeprägt ist. Zusätzlich weisen Muscheln eine optimale Größe für Untersuchungen auf der zellulären und der organismischen Ebene auf, und ihre physiolgischen, histologischen und biochemischen Eigenschaften sind ausreichend bekannt [16]. Sie besitzen zudem hoch konservierte Kontroll- und Regulationsmechanismen, welche oft homolog zu Vertebratensystemen sind und ein hohes Maß an Sensitivität für anthropogene Einträge aufweisen [21]. Aus diesen Gründen wird versucht, Muscheln, bzw. Mollusken als multidisziplinäre Modelle in der Umwelttoxikologie einzusetzen. Mittlerweile können auch multiparametrische Ansätze für den Nachweis spezifischer toxischer Wirkungen, z.B. immuntoxische Wirkungen an Muscheln und deren Zellen eingesetzt werden [22] [23]. Nicht zuletzt aufgrund der vielen homologen Grundfunktionen des Immunsystems der Muscheln mit denen von Vertebraten ist ihr Einsatz für die aquatische Immuntoxikologie sinnvoll [24], wenn es darum geht, basale immunmodulierende Einflüsse anthropogener Substanzen aufzudecken. In den folgenden Abschnitten soll daher gesondert auf das Immunsystem von Muscheln und dessen Funktionalität eingegangen werden.

1.2.3 Das Immunsystem von Muscheln

Muscheln verfügen neben ihren äußeren Schalen zum Schutz gegen Schadeinwirkungen über Körperepithelien, die antimikrobiell wirksam sein können [25] und wirkungsvolle Barrieren für Pathogene darstellen. Kommt es zu einer Verletzung ihrer Integrität, so verfügen Muscheln über eine Reihe von zellvermittelten und humoralen Antwortmöglichkeiten, die teilweise homolog zu den Verteidigungsmechanismen der Immunabwehr der Vertebraten sind (siehe Abb. 4). Als phylogenetisch relativ alte Organismen verfügen Muscheln hauptsächlich über angeborene unspezifische Immunfunktionen, die ihren Schwerpunkt auf der zellvermittelten Immunantwort haben [11]. Es besteht allgemeiner Konsens, dass zirkulierende Zellen der Hämolymphe, auch Hämozyten genannt, den Hauptbeitrag zur Verteidigung gegen mikrobielle und parasitäre Angriffe leisten [26]. Hämozyten sind zudem maßgeblich am Wundverschluss und der Einkapselung von Fremdkörpern beteiligt [25] und zeigen durch ihr ausgeprägtes Migrationsverhalten eine universelle Anwendbarkeit im Hämolymphsystem. Die Morphologie, Cytochemie und Ultrastruktur von Muschelhämozyten in mehreren Arten ist bereits bekannt [27] [28] [29]. Es ist jedoch strittig, wieviele unterscheidbare Hämozytentypen in den Hämolymphsystemen von Muscheln vorkommen, auch ist es unklar, ob es ein einheitliches hämatopoetisches Gewebe in Muscheln gibt [25]. Dennoch lassen sich mindestens zwei generelle Hämozytenpopulationen artübergreifend auf morpholgischer und zytologischer Basis unterscheiden, granuläre und agranuläre Hämozyten [30] [31], wobei die agranulären Formen auch Hyalinozyten genannt werden. Durch durchflusszytometrische Methoden zur Zellidentifizierung und Häufigkeitsbestimmung der in Invertebraten vorkommenden Hämolymphzellen haben sich die Möglichkeiten der Hämolymphuntersuchung enorm verbessert. So können bei bestimmten Muschelarten die Unterpopulationen der granulären und agranulären Hämozyten durchflusszytometrisch unterschieden werden [23]. Zwei Aspekte erschweren diese Forschungen erheblich: Zum einen herrscht in Muschelhämolymphen eine große Hämozytenvariabiltät vor [27]. Zum anderen gibt es kaum kommerziell erhältliche und standardisierte Reagenzien, die eine zuverlässige Unterscheidbarkeit der Hämozytenpopulationen zulassen. Auch wenn es bei einigen Muschelarten nicht möglich ist, die Unterschiedlichkeit der Hämozyten abzubilden, so gibt es eine Reihe methodischer Ansätze, die Gesamthämozytendichten im Hämolymphsystem zu bestimmen. Diese umfassen u.a. mikroskopische Auszählungen, den Einsatz von Zellzählgeräten oder durchflusszytometrische Bestimmungen, wobei einige dieser Methoden an Vitalitätsfärbungen gekoppelt werden können. Damit Immunfunktionen von den Hämozyten gewährleistet werden können, ist das Vorhandensein und die Vitalität der Hämozyten im Hämolymphsystem essentiell. Bestimmungen dieser Messparameter bilden also die Grundlage für die Erfassung weiterer funktioneller Leistungen dieser Hämozyten. Doch weisen auch diese Messparameter neben den interindividuellen Schwankungen saisonale Schwankungen auf [32].

Da Muscheln ein halboffenes Blutgefäßsystem besitzen, ist dieses relativ leicht durch Modulatoren zu beeinflussen und hat sich für den Nachweis immunmodulativer Potenziale bewährt. Es ist anzunehmen, dass es Aufgabenteilungen zwischen den verschiedenen Hämozytenpopulationen in Mollusken gibt. Für eine integrative Bewertung von Immunleistungen sollte die Funktion der Gesamthämolymphe im Vordergrund stehen, die sich aus den Einzelleistungen der Hämozyten und der Bestandteile der Hämolymphe zusammensetzt. Die Funktionen dieser Immunzellen und des Hämolymphsystems im Ganzen stehen daher im Fokus der Betrachtungen.

1.2.4 Funktionelle Ansätze zur Messung von Immunleistungen in Muscheln

Die Funktionen des Immunsystems können in humorale, d.h. an Körperflüssigkeiten gebundene und zellvermittelte Antworten unterteilt werden.

1.2.4.1 Zellvermittelte Immunantworten der Hämozyten

Phagozytose

Erstmalig wurden Phagozytoseprozesse von Ernst Haeckel 1862 an Radolarien beschrieben [33]. Die Phagozytose beschreibt generell die Aufnahme von partikulärem Material durch Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran in die Zelle [34]. Dieser Mechanismus diente primär Ernährungsvorgängen, wurde aber mit zunehmender Organisationshöhe der Organismen als zusätzliche immunologische Funktion für die Aufrechterhaltung ihrer Integrität verwendet. Die Phagozytosemechanismen sind gut konserviert in Vertebraten und Invertebraten, und die Sensitivität dieser biologischen Funktion gegenüber Umweltschadstoffen belegt die Sinnhaftigkeit der Verwendung von phagozytosebasierten Ansätzen im Umweltmonitoring [35]. In Muscheln wie in anderen Invertebraten beruht die Hauptleistung an antimikrobieller Verteidigungsaktivität auf den Mechanismen der Phagozytose [36] [26] [28]. Die Verteidigung gegen Fremdpartikel wird von phagozytoseaktiven Hämozyten gewährleistet, die in der Hämolymphe zirkulieren [37]. Expositionen gegenüber Umweltschadstoffen können zu einer Modulation der Phagozytoseaktivität der Hämozyten und damit zu einer Veränderung der Anfälligkeit gegenüber Krankheiten führen [23].

Die Phagozytose kann dabei in verschiedene Phasen unterteilt werden: Erkennung von Fremdpartikeln, Chemotaxis, Membrananheftung, Inkorporation und Zerstörung des Fremdmaterials [36]. Die Erkennung des Fremdmaterials kann z.B. durch Transmembranrezeptoren wie Integrine erfolgen [38], die weitere Phagozytoseprozesse modulieren. Die Zerstörung des Fremdmaterials findet in den Phagosomen durch die in den Lysomomen befindlichen Hydrolasen statt, indem Phagosomen mit den Lysosomen während des Verdauungsprozess miteinander fusionieren. Weitere Aufgaben der Lysosomen sind die Anreicherung von Xenobiotica und Metallen [39], die auch die Stabiltät der Lysosomen beeeinflussen können [40]. Pathogene, die größer als die Hämozyten sind, können von Hämozyten eingekapselt und immobilisiert werden.

Natürlich können nicht alle Einzelphasen der Phagozytose gleichwertig untersucht werden, doch ist es durch den kontinuierlichen Ablauf der Phagozytose möglich, eine späte Phase, z.B. nach der Inkorporation des Fremdmaterials zu untersuchen, die dann die Funktionalität der vorangegangenen Phagozytoseschritte integriert hat. Nimmt man schwerverdauliche Materialien für die Messung der Phagozytoseaktivitäten, so kommt es zu einer Anreicherung von Fremdmaterial in den Hämozyten, welche gut mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen zu quantifizieren ist. Die Phagozytoseaktivität der Hämozyten kann mikroskopisch [41] [42], mikrotiterplattenbasiert [43] [44] oder durchflusszytometrisch [45] [35] [23] gemessen werden. Teile dieser Phagozytoseantwort verlaufen temperaturabhängig. So kann sowohl die Adhäsionsfähigkeit von Hämozyten an Fremdpartikel, als auch die Aufnahmeleistung und die Verdauungsleistung, durch Temperatureinfluss herabgesetzt werden [41]. Unterschiedliche Hämozytenpopulationen einer Art können auch unterschiedliche Phagozytoseaktivitäten aufweisen [46], so wird, z.B. in Austern (*Crassostrea virginica*), über vergleichsweise höhere Phagozytoseaktivitäten der Granulozyten gegenüber agranulären Formen berichtet.

Für eine Bewertung von Phagozytosemodulationen ist die genaue Kenntnis von methodischen Rahmenbedingungen obligatorisch. Zusätzlich sind saisonale Effekte von freilebenden Tieren zu berücksichtigen, da diese von endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst werden können (siehe Abb. 158 in Kap. 4.4). So wurde über Einflüsse von Geschlecht, Fortpflanzungsperiode und Wassertemperatur auf die Phagozytoseaktivität berichtet [47] [48] [19] [49]. Trotz der Variabilität dieser Faktoren wird die Phagozytose als einer unter mehreren Immunparametern bewertet, der Aussagen über Umweltbelastungen an Expositionsstandorten erlaubt [50] [19] und eine Schlüsselrolle für den Nachweis immuntoxischer Potenziale besitzt [51].

Aggregations-, Adhäsions- und Lokomotionsverhalten

Auch wenn Aggregations- und Adhäsionsverhalten teilweise dem Phagozytoseprozess zugeordnet werden können, so bilden diese Eigenschaften auch gesondert einen wichtigen Beitrag zur Immunantwort. Die Adhäsions- und Aggregationsfähigkeit von Hämozyten trägt z.B. zum Wundverschluss und der Abwehr von Pathogenen durch deren Immobilisierung bei [25]. Größere Parasiten können von Hämozyten in mehreren Schichten eingekapselt immobilisiert werden. Direkt nach der Entnahme von Muschelhämolymphen sind Hämozytenaggregation und -adhäsion als spontane Ereignisse zu beobachten, die schon nach den ersten Minuten der Hämolymphentnahme auftreten. Wobei das Startsignal für diese Reaktion nicht bekannt ist. Bisher wurden Methoden entwickelt, die die Veränderung der spontanen Hämozytenaggregationsfähigkeit messen [23] [52] und zusätzliche Werkzeuge zur Erfassung von toxischen Einflüssen von Xenobiotica in Mollusken darstellen können [53]. Die Fähigkeit der Hämozyten, sich chemotaxisch zu orientieren, ist eine weitere Voraussetzung zur Verteidigung gegen Pathogene und kann durch Chemikalien inhibitiert werden [54]. Bei den Messparametern Adhäsionsfähigkeit an Fremdpartikeln und Lokomotionsraten der Hämozyten konnten in vivo Temperatur- und Salinitätseinflüsse festgestellt werden [55], die bei einer Bewertung immunmodulatorischer Effekte berücksichtigt werden müssen und die Anwendbarkeit der Messparameter in vivo erschweren.

1.2.4.2 Humorale Immunantwort und Produktion von Reactive Oxygen Species (ROS)

Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS-Produktion, oxidative Burst)

Freie Radikale sind chemisch definierte Spezies (Atome, Moleküle, Ionen), die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen. Molekularer Sauerstoff steigert seine Toxizität in biologischen Systemen, wenn sich seine Elektronenstruktur z.B. durch Reduktionen ändert. Die schrittweise Reduktion führt zu reaktiven Sauerstoffspezies, welche stärkere Oxidationsmittel als der Triplett-Sauerstoff sind (siehe Abb. 5). Die reaktiven Sauerstoffspezies sind z.B. Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale und werden im englischem Sprachraum unter dem Begriff "Reactive Oxygen Species" (ROS) zusammengefasst. Die Zuordung der ROS-Produktion zur humoralen Immunantwort ist nur teilweise richtig. Es werden durch den Kontakt mit Fremdmaterial NADPH-Oxidasen an den Membranen der Hämozyten aktiviert [39], die dann ROS produzieren, die außerhalb der Zellen wirksam sind. Doch wird ein Teil der ROS in den Zellen bei Phagozytoseprozessen generiert und in den Phagosomen eingesetzt. Damit erfüllt die ROS-Produktion Bedingungen der zellvermittelten Immunantwort und die extrazellulär aktiven ROS die Bedingung der humoralen Immunantwort.



Abb. 5: Aktivierung des molekularen Sauerstoffs und Elektronenverteilung in den äußersten besetzten Molekülorbitalen, aus [56]

Biologische Elektronentransferreaktionen, welche von NAD(P)H abhängigen Oxidasen katalysiert werden, sind wichtige Orte der ROS-Entstehung und umfassen folgende Reaktionen:

$$2O_2 + NAD(P)H \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$$

Eine Disproportionierungsreaktion von Superoxidanionen führt zu Wasserstoffperoxid.

$$2 \text{ } \text{O}_2^- + \text{ } 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \text{ } + \text{ } \text{O}_2$$

Wasserstoffperoxid kann, obwohl es selbst kein Radikal ist, über die Haber-Weiss-Reaktion [57] mit Superoxidanionen zu Hydroxyl-Radikalen und Hydroxidionen reagieren.

$$O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH + OH^-$$

Für das Wasserstoffperoxid besteht auch eine weitere Akivierungsmöglichkeit durch Myeloperoxidasen zu den noch reaktiveren Hypochlorsäuren [58].

$$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow OCl^- + H_2O$$

Einige der Hauptwirkungen dieser ROS in biologischen Systemen sind Lipidperoxidationen des zellulären Plasmas und von Organellenmembranen, Proteindegradationen, welche auch zu Enzyminaktivierungen führen können und DNA-Schädigung [39]. Zahlreiche Sekundärreaktionen können zelluläre Folgeschäden hervorrufen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. Damit die Hämozyten sich selbst vor den Auswirkungen der ROS-Produktion schützen können, enthalten sie als enzymatische Antioxidantien Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase [59], welche durch folgende Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies abbauen können (siehe Tab. 2).

Enzym	Abgefangene Spezies	Katalysierte Reaktion
Superoxiddismutase	O ₂ -	$2 \text{ O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Katalase	H_2O_2	$2H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$
Glutathionperoxidase	H_2O_2	H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG
	ROOH	ROOH + 2 GSH \rightarrow ROH + H ₂ O + GSSG

Tab.	2: Enzymatische	Schutzsysteme gegen	reaktive Sauerstoff	spezies, aus	[56]
		eenaaeyetenne gegen		00021000, 440	[00]

Neben den hier erwähnten enzymatischen Schutzsystemen gibt es eine Reihe von nichtenzymatischen Schutzsystemen, die antioxidative Wirkung entfalten können. Unter Belastungssituationen, z.B. durch die Induktion der ROS-Antwort durch Schwermetalle kann die Bildungsrate reaktiver Sauerstoffspezies die Kapazität antioxidativer Systeme übersteigen und es kommt zum oxidativen Stress [39]. Zusätzlich können Xenobiotika die Membranen der Lysosomen destabilisieren, was zu einer erhöhten Freisetzung von hydrolytisch wirkenden Enzymen führt. Nach pathologischen Veränderungen der Hämozyten, z.B. durch extrem vergrößerte Lysosomen kann es zu einer Selbstverdauung der Hämozyten (Autolyse) kommen [40]. Die lysosomale Membranstabilität kann daher auch als Stressindikator für Belastungssituationen in Muscheln durch Schwermetalle verwendet werden [60].

Es wurde bereits nachgewiesen, dass ein Teil der ROS-Produktion an die Phagozytoseaktivität gekoppelt ist, doch können auch chemische Stimulantien wie Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (auch TPA oder PMA genannt) speziesabhängig den "Oxidative Burst" aktivieren [61]. Die artspezifische Auslösung des Oxidative Burst zeigt, dass die Mechanismen der ROS– Produktion innerhalb der Bivalvia variieren können. Die Quantität der ROS-Produktion kann artspezifisch in den Hämozytenpopulationen ausgeprägter sein [62] und sich intra- und extrazellulär unterscheiden. Auch gibt es Berichte, dass von den Hämozyten bestimmter Muschelarten keine ROS-Produktion gemessen werden kann [63]. Dennoch bildet die ROS-Antwort einen wichtigen Bestandteil der Immunfunktionen bei Vertebraten [58] und Invertebraten. Es haben sich vielfältige Methoden entwickelt, diesen funktionellen Immunparameter zu erfassen. Der größere Anteil der ROS-Messungen basiert auf Mikrotiterplattenmessungen und erfolgt photometrisch [64] [65], flourimetrisch [66] und luminometrisch [67] [61]; nur ein Teil der Methoden greift auf durchflusszytometrische Ansätze zurück [23] [46].

Antimikrobiell wirkende Enzyme und humoral aktive Proteine

In den Körperflüssigkeiten von Invertebraten wurden verschiedene immunbezogene humorale Wirkungen beschrieben. Neben den zellulären Mechanismen können Muscheln ihre humorale Immunität durch die Produktion von verschiedenen Proteinen mit direkt oder indirekt zytotoxischen Eigenschaften erhöhen. So wird, z.B. über die humorale Wirkung von Agglutininen, opsonierenden Lektinen, verschiedenen Enzymen mit zytolytischer Wirkung, Lysozymen und Serinproteasen, in Muscheln berichtet [68] [69]. Eine zusätzliche humorale oxidative Wirkung kann durch oxidative Enzyme wie Phenoloxidase und Peroxidasen erreicht werden [43]. Die humorale Wirkung, auch Aktivität genannt, wird vorwiegend durch Hämozyten generiert, wobei Subpopulationen unterschiedliche Ausprägungsgrade an antimikrobiell wirkenden Peptiden aufweisen können [70]. Eine integrale Wirkungserfassung der verschiedenen humoralen Aktivitäten erweist sich durch die Unterschiedlichkeit der Wirkungsrichtungen schwierig. Ein Teil der antibakteriellen Peptidantwort kann beispielsweise durch die stimulierende Wirkung von Lipopolysachariden ausgelöst und nachgewiesen werden, doch unterliegen diese Prozesse einer Temperaturabhängigkeit [71]. Auch können Phagozytoseprozesse wie die Stimulation von Hämozyten durch Zymosan, eine wichtige Rolle bei der Generierung der humoralen Aktivität besitzen [72], was die Vielschichtigkeit der Immunantwort verdeutlicht. Es ist anzunehmen, dass zukünftig Genexpressionsanalysen für humoral aktive Proteine neue Erkenntnisse bieten. Erste Schritte in diese Richtung wurden beispielsweise für antimikrobiell wirkende Peptide in *Mytillus galloprovincialis* und *Mytilus edulis* getan [73][74].

1.2.5 Nachgewiesene Umwelteinflüsse auf den Immunstatus von Muscheln

Dass Umweltfaktoren eine modulierende Wirkung auf das Immunsystem haben, ist seit langem bekannt. Wie in vielen Invertebraten unterliegen absolute und relative differentielle Hämolymphzählungen von Muscheln großen Schwankungen. Ein Teil dieser Schwankungen wird durch interindividuelle Variabilität verursacht, doch kann ein anderer Teil in Zusammenhang mit biotischen und abiotischen Umweltfaktoren sowie mit saisonalen Rhythmen gebracht werden [32] [75]. Auch kann die Kombination aus abiotischen, biotischen und xenobiotischen Einflüssen weitere Immunparameter wie Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion modulieren [76], was den Nachweis von immuntoxischen Potenzialen im Freiland erschwert. Selbst in relativ nah verwandten Muschelarten kann die Ausprägung der Immunfunktionen sehr unterschiedlich sein, was ebenfalls bei immuntoxikologischen Ansätzen berücksichtigt werden muss [62]. Dennoch können xenobiotische Einflüsse auf den Immunstatus von Mollusken seit längerer Zeit beschrieben werden [77]. Dabei treten zelluläre und humorale Veränderungen von immunrelevanten Parametern auf (siehe Kap. 1.2.4). Auffallend ist, dass ein Großteil der in Tab. 3 dargestellten Wirkungen mit marinen Testverfahren in vitro und in vivo bestimmt werden kann, aber nur ein Bruchteil (Verhältnis ca. 5 zu 1) mit limnischen Testverfahren. Die folgende Tabelle stellt nachgewiesene Modulationen der Immunparameter von Xenobiotika in limnischen und marinen Testverfahren dar.

Tab. 3: Xenobiotika mit immunmodulativen Wirkungen auf Muscheln oder deren Hämozyten. (Die Inidizes an den Literaturquellen zeigen Modulationen von a = Phagozytoseaktivität, b= ROS-Produktion, c = Hämozytendichten, d = Adhäsionsverhalten, e = Aggregations-verhalten, f = Lokomotionsverhalten, g = humorale Aktivität im Hämolymphsystem an; h = Vitalität; große Buchstaben zeigen *In vivo*-Ansätze, kleine Buchstaben *In vitro*-Ansätze an. L steht für ein limnisches Testverfahren und M steht für ein marines Testverfahren)

Substanzgruppe	Bezeichnung	Literaturquelle		
Schwermetallverbindungen	Ag	[35] _{ahM} , [78] _{ahLM}		
	Cu	[43] _{ABCGM} , [53] _{eM} ,		
		[36] _{BCM} , [79] _{ABGM} , [80] _{BM} ,		
		[76] _{ABCM}		
	Cd	[35] _{ahM} , [53] _{eM} , [81] _{ACGM} ,		
		[36] _{CM} , [80] _{BM} , [78] _{ahLM}		
	Hg	[35] _{ahM} , [79] _{ABGM} ,		
		[82] _{ghM} , [83] _{AHM} ,		
		[78] _{ahLM}		
	Zn	[35] _{ahM} , [78] _{ahLM}		
Organometallverbindungen	CH₃Hg	[35] _{ahM} , [78] _{ahLM} , [83] _{AHM}		
	Organozinnverbindungen	[84] _{aM} , [85] _{aM} , [86] _{bfM} ,		
		[53] _{eM}		
Aromaten und PAK	Fluoranthen	[87] _{CGM}		
	Phenanthren	[88] _{ABGM}		
	Benzo(a)pyren	[89] _{bM}		
	PAK allgemein	[90] _{ACM} , [77] _{AGM} ,		
		[51] _{АСНМ} , [91] _{АСFM}		
	Ölemulsion	[90] _{ACM}		
	Phenol	[92] _{AHM}		
Halogenierte Aromaten und	PCB allgemein	[93] _{gM} , [51] _{ACHM}		
РСВ	chlorierte Phenole	[77] _{AGM}		
	TBBPA	[94] _{abgM}		
Sonstige Verbindungen				
Pharmazeutika	Bezafibrat,Gemfibrozil,			
	zyklin, Trimethroprim,	[95] _{adhL}		
	Novobiocin	[53] _{eM}		
	und Koffein			
Kommerzielle mikrobielle Produkte	siehe Literatur	[96] _{ABDHL}		
Hormonaktive Substanzen	17-β-Estradiol	[97] _{aAbGM} , [98] _{AM}		

Für viele Substanzen sind immuntoxische Wirkungen auf limnische Organismen derzeit gar nicht bekannt, was den Forschungsbedarf für eine Erarbeitung sensitiver immunrelevanter Messparameter hervorhebt. Viele xenobiotische Einträge (z.B. durch kommunale und industrielle Abwässer) aus Ballungsräumen verlagern sich über Flussysteme in marine Bereiche. Auf ihrem Weg können diese Substanzen ihr immuntoxisches Potenzial entfalten, bevor in den Meeren weitere Verdünnungseffekte einsetzen. Da in marinen Bereichen immuntoxische Effekte für diverse Xenobiotika (siehe Tab. 3) in umweltrelevanten Konzentrationsbereichen beschrieben wurden ist anzunehmen, dass diese Effekte auch für limnische Organismen in mindestens gleichem Umfang zutreffen.

Schwermetallverbindungen können in limnischen und marinen Muschelarten immunmodulierendes Potenzial besitzen [78]. Niedrige Konzentrationen können zu Aktivierungen der Phagozytoseaktivität in vitro führen, hingegen führen höhere Konzentrationen zu Hemmeffekte [19]. An diversen Pharmazeutika konnte immunmodulierendes Potenzial anhand mehrerer Immunparameter (z.B. Adhäsionsverhalten und Phagozytoseaktivität) in vitro abgeleitet werden [95]. Auch schwer wasserlösliche Substanzen wie PAKs und PCBs sind in der Lage, unterschiedlich gerichtete Immunmodulationen der Parameter der Hämozytendichte, der Phagozytoseaktivität, der ROS-Produktion und humoraler Parameter zu bewirken. Diese Wirkungen können sich durch ausgeprägte Persistenz und bioakkumulative Potenziale in der Umwelt verstärken. Die Organozinnverbindungen, die alle Ebenen der Ökotoxikologie beeinflussen können [1], stören ebenfalls immunrelevante Antworten wie die Phagozytoseaktivität und das Aggregationsverhalten sowie Lokomotionsraten von Hämozyten. Limnische und marine Molluskenarten sind in Deutschland Konzentrationen ausgesetzt, die deutliche Schädigungen der hormonellen Regulation erwarten lassen [99]; ob dies auch für das Immunsvstem zutrifft, bleibt ungeklärt. Teilweise werden gegensätzliche Aussagen über die Hemmwirkung von Substanzen auf die Immunparameter getroffen wie es für Ölemulsionen [100] oder Organozinnverbindungen [101] bezüglich der Phagozytoseaktivität der Fall ist. Dabei sollte nicht nur die Wahl der Immunparameter berücksichtigt werden, sondern auch die Durchführung der Experimente und der Status der Organismen. In ungünstigen Fällen kann die Verwendung weniger sensitiver Organismenarten zu Fehlinterpretationen führen [88].

Generell lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass Muscheln oder deren Hämozyten auf ein sehr weites Spektrum an anthropogenen Belastungen mit diversen Immunparametern (wie Hämozytendichten, Phagozytoseaktivität, ROS-Produktion, Adhäsions- und Aggregationsverhalten und der humoralen Aktivität) reagieren können. Die Untersuchungen für xenobiotische Immunmodulationen (siehe Tab. 3) belegen, dass multiparametrische Ansätze herangezogen werden müssen, um immuntoxische Potenziale ableiten zu können. Als Testorganismen eignen Muscheln sich auch, um immmunmodulative Potenziale für neuere Belastungsquellen, wie sie sich durch den vielfältigen Einsatz von Pharmazeutika, hormonaktiven und mikrobiellen Produkten und Flammenschutzmitteln abzeichnen, anzeigen zu können. Es sollte jedoch gelingen, valide Methoden für die Erfassung mehrerer grundlegender Immunparameter an geeigneten Organismen zu entwickeln, um das ökotoxikologische Ausmaß dieser Störungen auf den unterschiedlichen Ebenen erfassen zu können.

1.3 Vorgehensweise

1.3.1 Erfahrungsstand zu Beginn der Untersuchungen

Der DIN-Arbeitskreis 5.7 "Immuntoxizität für Organismen" hatte sich im Zeitraum von 09/1999 bis 03/2004 mit der Übertragung von gängigen Phagozytoseassays auf heimische limnische Teichmuschelarten (*Anodonta cygnea* und *Anodonta anatina*) beschäftigt. Aufgrund der relativ niedrigen Hämozytendichten (die um den Faktor 5-10 niedriger als bei marinen Muschelarten liegen), der verwendeten Testorganismen und deren vergleichsweise hohen interindividuellen Schwankungen, waren mikrotiterplattenbasierte Methoden zur Messung der Phagozytoseaktivität an ihre Grenzen gestoßen. Ein Forschungsprojekt wurde vom Umweltbundesamt nach dem UFO-Plan 2004 (FKZ: 20322384) des Umweltbundesamtes initiiert. Dessen Schwerpunkt lag in der Unterstützung für aquatische Tests im Rahmen der Normung: Erfassung immuntoxischer Effekte / Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten. Nach den Erfahrungen des DIN-Arbeitskreises 5.7 wurden neue durchflusszytometrische Messmethoden zur Messung der Phagozytoseaktivität favorisiert, da diese weniger stark von Hämozytendichten der Testorganismen abhängig sind.

1.3.2 Ziele und Aufgaben

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen die Identifizierung und Erarbeitung valider immunologisch relevanter Messparameter (Phagozytoseaktivität, Hämozytendichten, ROS-Produktion und Vitalität), die sich für einen Nachweis immunmodulierender Potenziale in der Umwelt eignen. Mehrere Messparameter der Phagozytoseaktivität wurden an phagozytoseaktiven Säugerzelllinien (HL 60-Zellen und P388-Mausmakrophagen) erarbeitet und wurden auf Muschelhämozyten von Anondonta anatina übertragen. Es sollten grundlegende physiologische Charakteristika (Einfluss von Hälterungsbedingungen, Regenerationsverhalten, Phagozytosekinetiken, Adhäsions-und Aggregationsverhalten von Hämozytenpopulationen) der Muschelhämozyten erabeitet werden, deren Kenntnis eine Voraussetzung für eine sichere Erfassung von akuten Modulationen der Immunparameter sind. In vergleichenden In vitro- Screening Testungen sollte die Sensitivität der Testverfahren gegenüber immuntoxischen Xenobiotika getestet und bewertet werden. Durch In vivo-Testungen von Muscheln mit immuntoxischen Referenzsubstanzen sollten die Expositionsbedingungen für eine Manifestation subchronischer immuntoxischer Effekte in sublethalen Konzentrationsbereichen erarbeitet und die Sensitivität der Organismen im Vergleich zu den In vitro-Testungen dargestellt werden. Auf der Grundlage der erarbeiteten Expositionsbedingungen wurden Abwasserprobenuntersuchungen von kommunalen und industriellen Abwässer unterschiedlicher Belastungsqualität durchgeführt. Für eine differenzierte Auflösung allgemeiner und spezifischer immuntoxischer Wirkung der Abwasserproben wurden in den Muschelexpostionsversuchen Verdünnungsstufen eingesetzt, in denen keine toxischen Wirkungen mit Algen-, Daphnien- und Leuchtbakterientest nachzuweisen waren. Die gefundenen immuntoxischen Wirkungen sollten durch Modulationen der Messparameter für Phagozytoseaktivität, ROS-Produktion, vitaler Hämozytendichte und Vitaltät der Hämozyten nach der Exposition und anschließender Regenerationsphase angezeigt und charakterisiert werden.
1.3.3 Durchführung und Fragestellungen der Untersuchungen

Nach den Grundsätzen der ökotoxikologischen Wirkungsebenen (siehe Kap. 1.1.1) wurden Methoden für die unterschiedlichen Organisationsebenen, in denen sich immunschädigende Effekte manifestieren können, erarbeitet. Diese Erfassungsebenen zeichnen sich durch einen unterschiedlichen methodischen und zeitlichen Aufwand, aber auch durch Unterschiede in der aquatischen bzw. ökologischen Relevanz und in Punkten der Standardisierbarkeit aus (Abb. 6). Die Dauer der Manifestation der untersuchten Effekte wird ebenfalls von der Wahl der Erfassungsebene bestimmt.



Abb. 6: Verwendete Erfassungssebenen der Immunparameter

Ebene 1: In vitro-Versuche mit Säugerimmunzellen

Es wurden zunächst durchflusszytometrische Alternativmethoden für phagozytoseaktive Säugerzelllinien (HL 60- und P388-Zellen) entwickelt, da diese mit geringem methodischem Aufwand phagozytoseaktive Immunzellen zur Verfügung stellen konnten. Zu diesen Zelllinien wurden entsprechende Fragestellungen formuliert:

- Eignen sich phagozytoseaktive HL 60-Zellen, um die verschiedenen Messparameter für die Phagozytoseaktivität zu erarbeiten?
- Können phagozytoseaktive HL 60-Zellen als Testverfahren zur Messung von *In vitro*-Effekten auf die Phagozytoseaktivität von Säugerimmunzellen eingesetzt werden?
- Sind die Messparameter der Phagozytoseaktivität auf andere Säugerimmunzellen, z.B. den P388 Mausmakrophagen übertragbar?

In relativ kurzer Zeit standen Methoden zur Messung der Phagozytoseaktivität und Vitalität der Säugerimmunzellen zur Verfügung, so dass eine Übertragung der Messtechnik unter Berücksichtigung der biologischen "Besonderheiten" der Muschelhämozyten stattfinden konnte.

Ebene 2: In vitro-Versuche mit Muschelhämozyten

In den Untersuchungen mit den Muschelhämozyten sollte eine Reihe von methodischen Störquellen identifiziert und berücksichtigt werden, die vergleichende Messungen funktioneller Immunparameter zwischen Säuger- und Muschelzellen zuließen (siehe Kap. 3.1) und die Bearbeitung folgender Fragestellungen ermöglichte:

- Sind die Messparameter der Phagozytoseaktivität auf Muschelhämozyten von Anodonta anatina übertragbar?
- Können Muschelhämozyten von *Anodonta anatina* in Primärkultur übernommen werden ?
- Können mit Muschelhämozyten von *Anodonta anatina* weitere Immunparameter wie die ROS-Produktion sowie Vitalitätsparameter erfasst werden?
- Können Muschelhämozyten von *Anodonta anatina* als Testverfahren zur Messung von *In vitro* Effekten auf die Phagozytoseaktivität eingesetzt werden?
- Eignen sich *In vitro*-Testungen mit Muschelhämozyten von *Anodonta anatina,* um xenobiotischische Einflüsse auf die Immunparameter Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion in umweltrelevanten Konzentrationsbereichen zu erfassen?

Mit den Methoden der Phagozytoseaktivität der Hämozyten wurde das Empfindlickeitsspektrum für diverse Xenobiotika mit bekannter immuntoxischer Wirkung erfasst (siehe Kap. 3.2.4).

Anhand von Schwermetallwirkungen an Muschelhämozyten und Säugerimmunzellen wurden auf der I*n vitro*-Ebene Empfindlichkeitsunterschiede der Testverfahren mit Säugerimmunzellen und Muschelhämozyten untersucht (siehe Abb. 160 in Kap. 4.5.2). Als zusätzlicher Messparameter wurde die ROS-Produktion von Muschelhämozyten mit einem mikrotiterplattenbasierten Verfahren eingesetzt und mit Schwermetallverbindungen getestet.

Ebene 3: In vivo-Versuche mit Entenmuscheln

Insgesamt lagen die ermittelten Wirkkonzentrationen der *In vitro*-Tests nicht in umweltrelevanten Bereichen, so dass ausgehend von den *In vitro*-Nachweisgrenzen Expositionsszenarien mit Referenzsubstanzen (NiCl₂ und CH₃HgCl) für Muscheln eingesetzt wurden. Dazu erfolgten vor den Expositionsversuchen Laborhälterungen, die hälterungsbedingte Schwankungen (Temperatur, chemisch physikalische Wasserqualität) minimieren sollten. Folgende Fragestellungen wurden für diese Erfassungssebene untersucht:

- Können die Laborhälterungsbedingungen von Entenmuscheln für mehrmonatige Laborhälterungen standardisiert werden?
- Können *In vivo*-Expositionszenarien mit Entenmuscheln immunmodulative Wirkungen anhand von Referenzsubstanzen anzeigen?
- Ist der immunologische Belastungszustand am bioakkumulativen Verhalten der Testorganismen für Referenzsubstanzen zu bestimmen?

- Lassen sich die aus den Expositionsszenarien ermittelten Versuchsbedingungen auf belastete Abwasserproben mit allen Messparametern übertragen?
- Eignen sich *In vivo*-Expositionszenarien mit Entenmuscheln, um subletale subchronische immunmodulierende Potenziale anhand mehrerer Messparameter anzuzeigen?

Bei den *In vivo*-Expositionen kam es in subletalen Konzentrationsbereichen zu immunmodulativen Effekten der Phagozytoseaktivität in Abhängigkeit von der Expositionszeit und -konzentration (siehe Kapitel 3.3). Ein Empfindlichkeitsvergleich von *In vitro-* und *In vivo*-Methoden für die getesteten Referenzsubstanzen und auch zu den Mortalitätskonzentrationen anderer Mollusken wurde erstellt (siehe Kap. 4.5.3). Während der Exposition wurde das bioakkumulative Verhalten der Referenzsubstanzen ebenfalls untersucht (siehe Kap. 3.3.4).

Nachdem geeignete Expositionsbedingungen bestimmt wurden, konnten auch Abwasserproben kommunaler und und industrieller Kläranlagen in Verdünnungsstufen getestet werden, in denen keine allgemein toxischen Wirkungen nach den gängigen biologischen Testverfahren der Abwasserabgabeverordnung nachzuweisen waren (siehe Kap. 3.4 und Kap. 4.3.2).

Ebene 4: In vivo-Frei(land)exposition von Entenmuscheln

Parallel wurden die Messparameter der Phagozytoseaktivität und die vitalen Hämozytendichten von Muscheln in einer Rheinwasserhälterung im Jahresgang 2006 erfasst und im Vergleich zu Laborhälterungsbedingungen gestellt (siehe Kapitel 3.5), was die Bearbeitung folgender Fragestellungen ermöglichen sollte:

- Unterliegt die Phagozytoseaktivität und die vitale Hämozytendichte von im Rheinwasser exponierten Entenmuscheln saisonalen Schwankungen, die in Zusammenhang mit Umweltfaktoren gebracht werden können?
- Können *In vivo-*Expositionen von Entenmuscheln im Freiland immunmodulierende Potenziale anzeigen?

2 Material und Methoden

2.1 Mess- und Testprinzip zum durchflusszytometrischen Ansatz

2.1.1 Messprinzip der Durchflusszytometrie

Aufgrund des höheren Probendurchsatzes bei hohem Aussagegehalt finden durchflusszytometrische Methoden gegenüber mikroskopischen Ansätzen immer mehr Anwendungsbereiche in der Immuntoxikologie. So kann die Phagozytoseaktivität [45] [35] [23] in verschiedenen methodischen Ansätzen gemessen werden. Durch das Zusammenwirken von Optik, Fluidik und Elektronik können mehr als 200000 Zellen oder Partikel pro min erfasst werden, worin der wesentliche Vorteil gegenüber der Mikroskopie besteht. Es werden supendierte Einzelzellen, Zellaggregate oder Partikel hydrodynamisch fokussiert und passieren in einer Messküvette einen Laserstrahl. Nach der Beschaffenheit des passier-enden Zellmaterials wird der Laserstrahl in Längs- und in der Querrichtung abgelenkt und von Photodioden und multipliern nach Passieren eines Linsen- und Filtersystems erfasst (Abb. 7). An den Detekto-



Abb. 7: Schematische Darstellung des optischen Systems eines Durchflusszytometers aus [102]

ren kommt es zur Umwandlung der optischen Signale zu elektronischen Signalen, bzw. Spannungspulsen, die sich durch Höhe, Fläche und Weite charakterisieren lassen und an den Computer, nach entsprechender Vorverstärkung, weitergeleitet werden. Größere Objekte streuen das Licht stärker in Längsrichtung, es kommt in einem Winkel zwischen 0 und 10 ° einem verstärkten zu Vorwärtsstreulichtsignal (FSC), als relatives Maß für die Zellgröße. Objekte, die eine komplexe Licht brechende Oberfläche oder inhomogene, bzw. granuläre

Strukturen im Inneren besitzen, lenken das Licht stärker in Querrichtung ab. Es kommt in einem Winkel um 90 ° zu einem verstärkten Seitwärtsstreulichtsignal (SSC), als relatives Maß für die Komplexität der Zellen. Verschiedene Subpopulationen von Zellen können allein durch ihre Streulichtcharakteristika getrennt voneinander bestimmt werden.

Weitere Aussagen über Zellen gelingen jedoch durch die Anwesenheit von Fluorochromen in



Abb. 8: Aussenansicht und Auswerteeinheit des verwendeten Durchflusszytometers (FACS-Calibur)

oder an den Zellen, die durch den Laserstrahl anregbar sind. So sind einige Zellen, durch das z.B. Vorhandensein von Photosystemen autofluoreszent. Andere Zellen können aber durch mit Antikörper konjugierten Fluoro-chromen oder anderen Fluoreszenz-farbstoffen spezifisch markiert werden, womit sie fluoreszent werden. Heutige Durchflusszytometer (Abb. 8) sind in der Lage, mit den geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen und Kompensationsverfahren zwischen 3 und 6 Fluoreszenzkanälen parallel aufzulösen.

Messung der Phagozytoseaktivität von Immunzellen

Die durchflusszytometrische Erfassung der Immunzellen sollte parallel die Aufnahme von fluoreszierenden Latexpartikeln und die Vitalität der Immunzellen in zwei getrennten Fluores-



zenzkanälen ermöalichen. Das Fluoreszenzsignal der phagozytoseaktiven Zellen ist dabei proportional zur Anzahl der aufgenommenen fluores-Latexpartikel zenten (Abb. 9). Die Anzahl der passierten Immunzellen sowie deren Fluoreszenzintensität wird für mehrere tausend Zellen gespeichert und anschließend in und Histo-Dotplot-

Abb. 9: Messprinzip der Phagozytoseaktivität von Immunzellen

grammdarstellungen ausgewertet. Nekrotische Zellen konnten durch die Bindungsfähigkeit eines nicht membrangängigen DNA-Farbstoffs bestimmt werden (siehe Kap. 3.1.1.1).

2.1.2 Testprinzip zur Messung der Phagozytoseaktivität von Immunzellen

Die Phagozytose besteht aus mehreren nacheinander ablaufenden Schritten (siehe Kapitel 1.2.4.1). Eine Störung nur eines dieser Schritte kann die Funktionalität der Phagozytose beeinflussen. Daher war es wichtig, einen möglichst späten Punkt im Phagozytoseprozess zu betrachten. Die erfolgte Partikelaufnahme wurde als Endpunkt für die Phagozytoseaktivität gewählt, die sich mit fluoreszierenden Partikelquellen durchflusszytometrisch anhand verschiedener Messparameter gut charakterisieren lässt. Da es sich bei der Phagozytose um einen relativ unspezifischen Mechanismus der Fremdpartikelaufnahme handelt, wurde eine Partikelquelle gewählt, die sowohl die Größenverhältnisse von Bakterien simuliert, als sich auch durch gute Fluoreszenzeigenschaften von gleichbleibender Qualität auszeichnet. Es handelt sich um Latexpartikel mit dem Durchmesser von 1 μ m, die einen inkorporierten Fluoreszenzfarbstoff besitzen, der von der Leuchtkraft 1,3 x 10⁷ Fluoreszeinäquivalenten pro Partikel entspricht. Damit können auch weniger empfindliche Geräte die Partikelaufnahmen quantifizieren. Durch Inkorporation des Fluoreszenzfarbstoffs sind mögliche Probeneinwirkungen, die zu einer Verminderung der Fluoreszenzintensität führen, nahezu unterbunden.

Das Testgut kann optional für *In vitro*-Testungen eingesetzt werden. Bei *In vivo*-Testungen wird der gesamte Organismus exponiert. Da ein konstantes Partikel/Immunzellenverhältnis eingestellt wird, sind die Messungen unterschiedlicher Immunzellen unter Berücksichtigung der methodischen Rahmenbedingungen (Temperatur, Schüttelfrequenz, Versuchzeit usw.) vergleichbar, und es können modulative Wirkungen auf die Phagozytoseaktivität (Abb. 10) erfasst werden.



Abb. 10: Testprinzip und Antwortmöglichkeiten der Phagozytoseaktivitätsmessung

Die Phagozytoseaktivität kann durchflusszytometrisch und mikroskopisch mit drei Messparametern charakterisiert werden:

- Der Phagozytoseanteil gibt den prozentualen Anteil der Immunzellen an der Gesamtzellzahl an, die Latexpartikel aufgenommen haben.
- Die Phagozytoseleistung der phagozytoseaktiven Zellen gibt die mittlere Latexpartikelaufnahme pro aktive Immunzelle an.
- Die Phagozytoseleistung der Gesamtzellzahl gibt die mittlere Latexpartikelaufnahme pro erfasste Zelle an.

Durchflusszytometrisch sind Zellen nicht immer von "Objekten" in Zellgröße zu unterscheiden, deshalb hat sich der Begriff Ereignis bewährt.

- Gesamtereignisse (GE) sind demnach alle Objekte in Zellgröße
- Positivereignisse (PE) sind Objekte in Zellgröße mit fluoreszierenden Partikeln
- Negativereignisse (NE) sind Objekte in Zellgröße ohne Aufnahme der Latexpartikel

Unter zytotoxischen Einflüssen kann sich der Anteil der Zellen an den Gesamtereignissen reduzieren indem sich der Trümmeranteil in Zellgröße erhöht. Unter unbelasteten Bedingungen ist der Anteil der Objekte in Zellgröße (GE), die keine Zellen sind gering.

2.2 Methoden mit Säugerimmunzellen

Da der Umgang mit Zellkulturen viele sich wiederholende Schritte unter steriler Arbeitsweise beinhaltet, ist der dafür notwendige Geräte- und Chemikalienbedarf den folgenden Kapiteln vorangestellt. Die Folgekapitel beschäftigen sich daher mit der Durchführung.

Geräte und Materialien

- Accuvetten (Fa. Beckmann Coulter GmbH)
- Autoklave, Tuttnauer 3870 ELV, (Fa. Systec)
- Binokular, Axiovert 25 (Fa. Zeiss)
- Brutschrank, HERAcell (Fa. Heraeus)
- Einmal-Sterilpipetten, 10 ml
- FACS Calibur- Durchflusszytometer (Fa. Becton Dickinson)
- Fluoreszenz-Mikroskop und Zubehör (Fa. Zeiss, Typ: Imager Z1)
- Flüssigstickstoffbehälter, diverse Fabrikate
- Freezing Containers (Fa. Nalge Nunc International)
- Handschüttelgerät, Minishaker, MS 2 (Fa. IKA Labortechnik)
- Kühlschrank 4 °C, (Fa. Liebherr)
- Kryoröhrchen, Cryoware Cryogenic Vials, 1 ml (Fa. Nalge Nunc International)
- Objektträger (Fa. Marienfeld) und Deckgläser 24 x 60 mm (Fa. Menzel-Glaser)
- Schüttelinkubator, besteht aus Schüttelmaschine R010 (Fa. Gerhard) in Brutschrank Rumed Typ 3101

- (Fa.Rubarth Apparate GmbH)
- Sterile Bechergläser
- Sterile Reaktionsgefäße (PE), 1,5 ml, Safe-Lock Tubes (Eppendorf-Reaktionsgefäße, Fa. Eppendorf AG)
- Sterile Suspensionskulturflaschen 50 ml, 25 cm² (Fa. Greiner Bio-One International AG)
- Sterile Pipettenspitzen und Pipetten
- Sterilwerkbank, Hera safe, (Fa. Heraeus)
- Pipettierhilfe, Accu-Jet, (Fa. Brand)
- Polystyrolröhrchen, 5 ml, Polystyrene Round-Bottom Tube (12 x75 mm) (Fa. Becton Dickinson)
- Tiefkühlschrank -80 °C, Hera freeze, (Fa. Heraeus)
- Wasserbad, HS-B20, (Fa. IKA Labortechnik)
- Zellzählgerät, Coulter Counter Multisizer 3 (Fa. Beckmann Coulter GmbH)
- Zentrifuge 5415R (Fa. Eppendorf AG)

Chemikalien und Lösungen

- BSA, 3%ig (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 0,9% NaCl
- Dimethylsulfoxide (DMSO) minimum 99,5% GC (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- FACS-Flow- Trägerflüssigkeit, FACS-Rinse, FACS-Clean (Fa. Becton Dickinson)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (tested for Mycoplasma) (Fa. Biochrom AG)
- FluoSpheres carboxylate-modified microspheres, 1,0 μm Ø, yellow-green fluorescent (505/515) (Fa. Molecular Probes, Invitrogen, Bestell-Nr.: F8823)
- Flüssiger Stickstoff (Fa. Linde AG)
- Inkubationspuffer 10 mM Hepes, 5mM CaCl₂, 140 mM NaCl (Chemikalien von Fa. Merck), pH einstellen auf 7,4
- Isoton II (Fa. Beckmann Coulter GmbH)
- NaCI-Lsg. 0,9% (Fa. Merck)
- Propidiumjodid (PJ), (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Bestell-Nr. P4170, 100 mg)
- PJ-Stammlösung: 50 µg PJ/ml Inkubationspuffer
- PJ-Markierungslösung: 1020 µl Inkubationspuffer + 20 µl PJ-Stammlösung
- RPMI-Medium: RPMI 1640 + L-Glutamine (Fa. Gibco, Invitrogen)
- Trypsin/EDTA Solution (0,05% /0,02%) (Fa. Biochrom AG)

2.2.1 Verwendung der HL 60-Zelllinie zur Erarbeitung von Phagozytoseparame tern

Die HL 60-Zelllinie wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer Patientin, die an Promyelozytenleukämie erkrankt war, etabliert [119]. Seitdem wurde die HL 60-Zelllinie in vielen Publikationen als Promyelozytenleukämie repräsentierende Zelllinie bezeichnet. Die HL 60-Zelllinie ist in der Lage, durch chemische Stimuli *in vitro* in zahlreiche Zelltypen zu differenzieren.



Abb. 11: Stammbaum der Hämatopoese aus [103].

Die Differenzierung von HL 60-Zellen in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen führt zu einer verstärkten Phagozytoseaktivität gegenüber undifferenzierten HL 60-Zellen [104]. Sehr gute Wachstumseigenschaften in einer Suspensionskultur und die damit verbundende gute Nachweismöglichkeit in der Durchflusszytometrie durch hohe Zelldichten und nur geringe Testansatzvorbehandlungen vor der Messung führten zu der Entscheidung, diese Zelllinie zu verwenden.

2.2.2 Herkunft der HL 60-Zellen

Die Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) unter der DSMZ-Nr. ACC3 bezogen. Es handelt sich um eine Zelllinie von human acute myleoid leukemia Zellen, die in Suspension wächst.

2.2.3 Kultivierung und Wachstum der HL 60-Zellen

Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte wurde mit dem Coulter Counter bei 100 µm Kapillaröffnungsweite, einem Probenvolumen der Zellsuspension von 100 µl und 10 ml Isoton II und 1000µl Messvolumen im Doppelansatz bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Multisizer 3 Software.

Auftauen der Zellen

Die gefrorene Zellsuspension in den Kryoröhrchen wurde in einem Wasserbad bei 37 °C unter vorsichtigem Schwenken erwärmt, bis sich der Inhalt der Kryröhrchen verflüssigte. Der Inhalt konnte unter sterilen Bedingungen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen überführt und bei 250 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und mit einer 200 μ l Pipette abgesaugt. Vorgewärmtes RPMI 1640-Medium mit 20%igem FBS-Anteil wurde tropfenweise auf das Zellpellet zugegeben und im Anschluss für eine Resuspension durch mehrmaliges Pipettieren genutzt. Es wurde die Zelldichte mit dem Coulter Counter bestimmt. Durch erneute Zugabe von RPMI 1640-Medium mit 20 %igen FBS–Anteil auf eine optimale Wachstumsdichte zwischen 0,5 - 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt.

Passagierung von Zellen

Das Umsetzen der Zellen erfolgte mit RPMI-1640 Medium mit 10% FBS–Anteil in 50 ml Suspensionskulturflaschen. Der Serumanteil wurde zuvor bei 56 °C im Wasserbad für 30 min erwärmt. Dieser Vorgang diente zur Inaktivierung von Viren und des Komplement-Systems. Das Wachstum der Zellen fand im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre statt. Das Umsetzen erfolgte aufgrund des schnellen Wachstumsverhaltens im Abstand von 2 Tagen, im Montag-, Mittwoch-, Freitag-Rhythmus. Vor dem Umsetzen wurde die Zelldichte mit dem Coulter-Counter bestimmt, wobei die Zellzahl zwischen 5 bis 8 x 10⁵ Zellen/ml lag und auf eine Zellzahl von ca. 1 x 10⁵ Zellen/ml mit Medium eingestellt wurde. Die passagierten Zellsuspensionen wurden im Doppelansatz angelegt, wovon eine zur weiteren Kultivierung verwendet und eine andere als Sicherung bis zum nächsten Umsetzen aufbewahrt wurde.

Einfrieren von Zellen

Zum Schutz vor Kontaminationen und Subkultivierungen wurden die Zellen aus niedrigen Passagenzahlen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C konserviert. Das Einfrieren erfolgte mit RPMI-1640-Medium mit 10% DMSO und 20% FBS in Kryoröhrchen. Als kryoprotektive Substanz wurde DMSO gewählt, da diese gegenüber Glycerin schneller in die Zellen diffundiert und die Kristallbildung innerhalb der Zelle schnell minimiert. Um eine gleichmäßige Abkühlung der Zellsuspension zu gewährleisten, wurden Freezing Containers benutzt, die mit Hilfe von Isopropanol einen konstanten Einfrierprozess von -1 °C/min im -80 °C Kühlschrank bewirken. Nach 24 h im -80 °C Tiefkühlschrank wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von HL 60-Zellen

Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde eine Wachstumskurve von HL 60-Zellen erfasst. Ausgehend von einer Zelldichte von ca. 18000 Zellen/ml wurden die Zelldichten aus verschiedenen Ansatzflaschen zu bestimmten Versuchszeitpunkten mit dem Coulter Counter bestimmt (Ergebnisse in Abb. 29 in Kap. 3.1.1.1). Die untersuchten Zellkulturflaschen wurden anschließend verworfen.

2.2.4 Vitalitätsbestimmung von HL 60-Zellen

Das Messprinzip

Die Vitalitätsbestimmung der HL 60-Zellen wurde mit Propidiumjodid durchgeführt. Propidiumjodid ist ein roter DNA-Farbstoff, der seine Fluoreszenzintensität um ein Vielfaches erhöht, sobald er an DNA bindet. Propidiumjodid ist nicht membrangängig, so dass der Farbstoff nur in nekrotische Zellen mit beschädigten Membranen eindringen und dann an DNA binden kann. Er zeigt also späte zytotoxische Effekte an Zellen, bzw. nekrotische Zellen an.

Durchführung der Propidiumjodidfärbung

HL 60-Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen wurden mit Kulturmedium auf eine Zellzahl zwischen 0.2 bis 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Es wurde die Zelldichte mit dem Coulter Counter bestimmt. Die Zellen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen überführt und für 5 min bei 250 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und vorsichtig mit einer 200 µl Pipettenspitze abgesaugt. Das Pellet wurde mit dem gleichen Volumen an Kulturmedium durch 5 maliges Einsaugen und Ausstoßen mit einer 1000 µl Pipettenspitze resuspendiert und anschließend mit dem Handschüttelgerät für 5 s bei 2500 U/min durchmischt. Die Zellsuspension wurde erneut für 5 min bei 250 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals dekantiert und vorsichtig mit einer 200 µl Pipettenspitze abgesaugt. Das Pellet wurde mit 100 µl PJ-Markierungslösung durch 5 maliges Einsaugen und Ausstoßen mit einer 1000 µl Pipettenspitze resuspendiert und anschließend mit dem Handschüttelgerät für 5s bei 2500 U/min durchmischt. Die Färbungszeit betrug 10 min bei RT. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 250 x g bei RT. Der Überstand wurde dekantiert und vorsichtig mit einer 200 µl Pipettenspitze abgesaugt. Das Pellet wurde mit 400 µl Inkubationspuffer durch 5 maliges Einsaugen und Ausstoßen mit einer 1000 µl Pipettenspitze resuspendiert und anschließend mit dem Handschüttelgerät für 5 s bei 2500 U/min durchmischt und in 5 ml PS-Röhrchen überführt. Der Ansatz war für die durchflusszytometrische Messung vorbereitet. Vortestungen ergaben, dass die Färbung für mindestens 2 h stabil ist und sich der nekrotische Anteil bei dieser Färbekonzentration nicht verschiebt.

Messung der Vitalitätsanteile im Durchflusszytometer

Die Messung erfolgte mit dem höchsten Probeneinzug von ca. 60 µl/min. Es wurden 50000 Ereignisse erfasst. Es haben sich folgende Geräteeinstellungen am FACS Calibur bewährt.

Detektor	Voltage	Amp Gain	Mode (Ver- stärkung)
FSC	E-00	1,50	Lin
SSC	310	1,00	Lin
FL 1	300		Log
FL 2	300		Log
FL 3	600		Log

Tab. 4: Grundeinstellungen für die Messung von HL 60-Zellen mit Propidiumjodid

Der Treshold wurde auf 0 gesetzt. Eine Auswertungsmaske wurde als Dotplot mit Cell Quest Pro erstellt, indem FSC gegen FL3 aufgetragen wurde (siehe Abb. 30 und 31 in Kap. 3.1.1.1).

2.2.5 Phagozytoseansatz mit HL 60-Zellen

Da die Wachstumsphase Einfluss auf die Vitalität der Zellen und damit auch auf die Phagozytoseaktivität der Zellen haben kann, wurden nur Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet, da in dieser Phase der nekrotische Anteil der Zellen gering ist.

Vorbereitung der Zellsuspension

HL 60-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden auf 1,0 x 10⁶ Zellen/ml mit Kulturmedium eingestellt. Es wurde die Zelldichte mit dem Coulter Counter bestimmt. Die Verdünnungsschritte wurden mit Kulturmedium für HL 60-Zellen durchgeführt.

Herstellung der Bead-Suspension

Ein konstantes Latexpartikel (Bead)-Zellenverhältnis von 100 zu 1 wurde eingestellt, um vergleichbare Aufnahmebedingungen für die Testansätze herzustellen. Das Einstellen der Bead-Suspension erfolgte mit 0,9% iger NaCI-Lsg. auf. 1 x 10^8 Beads/ml. Die Messungen wurden im Coulter-Counter mit Isoton II und einer 20 µm Kapillaröffnung, einem Messvolumen von 50 µl und einem Probenvolumen von 100 µl, welches zuvor in 10 ml Isoton II gegeben wurde, im Doppelansatz durchgeführt.

Zusammensetzung des Testansatzes

Der Testansatz erfolgte in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen und bestand aus drei Komponenten:

- 0,1 ml Zellsuspension mit 1 x 10^5 Zellen
- + 0,1 ml Bead-Suspension mit 1 x 10⁷ Latexpartikeln in 0,9% iger NaCl-Lösung
- + 0,1 ml 0,9% ige NaCl-Lösung oder Probe in 0,9% iger NaCl-Lösung

Da die Zellen sehr temperatursensitiv sind, muss auf Temperaturstabilität geachtet werden.

Inkubation des Testansatzes

Die Inkubation des Testansatzes erfolgte im Schüttelinkubator bei 37 °C und 150 U/min bei einer kreisförmigen Auslenkung von ca. 1 cm. Nach Beendigung der Inkubation sollten die Proben auf Eis gelagert werden, um weitere Phagozytoseprozesse zu minimieren.

Vorbereitung der Testansätze für die durchflusszytometrische Messung

Die Trennung der Beads von der Zellsuspension erfolgte durch Zentrifugation bei 250 x g bei 4 °C für 10 min. Die Zentrifugation wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Testansatz wurde vor der Zugabe ca. 5 s auf dem Handschüttelgerät bei 2500 U/ min durchmischt. Das Pellet verliert mit zunehmender Standzeit an Konsistenz, d.h. Überstand und Pellet wurde schnell voneinander getrennt. Der Überstand konnte durch Dekantieren und vorsichtiges Absaugen mit der Pipette verworfen werden. Das Pellet wurde in 0,3 ml 0,9% iger NaCI-Lsg. durch 5 maliges Einsaugen mit der Pipette resuspendiert und anschließend für 5 s auf dem Handschüttelgerät bei 2500 U/min durchmischt. Je 0,3 ml des resuspendierten Testansatzes wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 1 ml 3%iger BSA-Lösung durchmischt und für 10 min bei 250 x g und 4 °C zentrifugiert. Vortestungen ergaben, dass über 90% der Zellen bei diesem Waschschritt erhalten bleiben und über 95% der Latexpartikel abgetrennt werden, was weitere Phagozytoseprozesse während der Messung minimiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren und vorsichtiges Absaugen mit der Pipette verworfen. Das Pellet wurde in 0,3 ml 0,9% iger NaCl-Lsg. resuspendiert und anschließend für 5 s auf dem Handschüttelgerät bei 2500 U/min durchmischt und in 5 ml PS-Röhrchen überführt. Der Testansatz war für eine Messung im Durchflusszytometer vorbereitet.

Messung im Durchflusszytometer

Die Messung erfolgte mit dem höchsten Probeneinzug von ca. 60 µl/min. Nach einer Messung von 10000 Ereignissen in Zellgröße wurde die Messung beendet. Alle Messungen erfolgten im Dreifachansatz; dabei wurden die gleichen Geräteeinstellungen am FACS Calibur wie für die Vitalitätsbestimmung gewählt (siehe Tab. 4). Eine Auswertungsmaske zur Messung des Phagozytoseanteils wurde als Dotplot mit Cell Quest Pro erstellt, indem FSC gegen FL1 aufgetragen wurde (siehe Abb. 35 bis 37 in Kap. 3.1.1.2). Eine weitere Auswertungsmaske zur Berechung der Phagozytoseleistungen erfolgte als Häufigkeits-histogramm FL 1 gegen die kumulative Häufigkeit der fluoreszenten Ereignisse in Zellgröße (PE), siehe Abb. 38. Die Berechnung der verschiedenen Parameter für die Phago-zytoseaktivität ist aus den Ergebnisteil 3.1.1.2 zu entnehmen. Eine simultane Bestimmung von Vitalität und Phagozytoseaktivität konnte trotz Kompensation nicht erfolgen, da das Fluoreszenzsignal der gelbgrün fluoreszierenden Latexpartikel die Fluoreszenz des Propidiumjodids noch im roten Fluoreszenzkanal bei 650 nm stark überlagerte. Erst spätere methodische Anpassungen bei Messungen mit Muschelhämozyten erlaubten die gleichzeitige Bestimmung von Vitalität und Phagozytoseaktivität (siehe Kap. 2.4.3).

Temperaturversuche

Die Temperaturversuche zur Bestimmung des Temperatureinflusses auf die Phagozytoseaktivität wurden am gleichen Tag in verschieden temperierten Schüttelinkubatoren mit vergleichbarer Schüttelqualität (150 U/min, 1 cm kreisförmige Auslenkung) im Dreifachansatz durchgeführt (siehe Kap. 3.1.1.4).

2.2.6 Differenzierungsstimuli für HL 60-Zellen

Verschiedene Differenzierungsstimuli, bestehend aus Dimethylsulfoxid (DMSO), 9-cis-Retinoinsäure (RA), ein Derivat des Vitamin A, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA oder PMA) und 1 α -2,5 Dihydroxyvitamin D₃ wurden in der Diplomarbeit von Denise Spira [105] mit dem Ergebnis getestet, dass eine gleichbleibende Phagozytoseaktivität mit guten Wachstumseigenschaften von differenzierten HL 60-Zellen nur schwer zu erreichen ist. Eine Ersatzmethode wurde daher mit der ausdifferenzierten teilungsfähigen adhärenten P388-Mausmakrophagenzelllinie entwickelt.

2.2.7 Die P388-Mausmakrophagenzelllinie

Die Zellinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) unter der DSMZ-Nr. ACC288 bezogen. Es handelt sich um eine adhärente Mausmakrophagenzelllinie, die hohe Phagozytoseaktivität zeigt.



Abb. 12 und 13: Mikroskopaufnahmen von P388 Zellen vor und nach Phagozytoseaktivität mit fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln

Die spindelförmigen, größeren Zellen zeigen die übliche adhärente Form dieser Zelllinie. Analog zur HL 60-Zelllinie wurde eine Testvorschrift zur Messung von Phagozytoseaktivität und Vitalität erarbeitet, die aus [105] zu entnehmen sind.

2.3 Methoden der Muschelexperimente

Für eine bessere Lesbarkeit des Kapitels wurde der notwendige Geräte- und Chemikalienbedarf vorangestellt. Ausnahmen bilden die Unterkapitel 2.2.3.2 mit der umfangreichen Herstellung der Bringmann-Kühn-Lösung und die Standardarbeitsanweisungen der Schwermetallanalytik in Kapitel 2.2.5

Geräte und Materialien

- Accuvetten (Fa. Beckmann Coulter GmbH)
- Algentoximeter (Fa. bbe Moldaenke)
- Aluminium-Waagschalen (Innendurchmesser 8 cm) und Aluminiumfolie
- Ammoniumtest LCK 304 (Fa. Hach Lange GmbH)
- Aquarienpumpe (Rena Air 100, Fa. Rena)
- Autoklave, Tuttnauer 3870 ELV, (Fa. Systec)
- Einmal-Kanülen, steril 0,6/60 mm (Fa. VWR BestelL-Nr.: 6120158)
- Exsikkator, 10 I Volumen
- Falcon Tube, 50 ml (Fa. Greiner)
- Gefriertrocknungsanlage (Fa. Christ, Typ: Alpha 1-4)
- Glasgefäße, 30 ml mit Schraubdeckelverschluss (Fa. VWR)
- Handschüttelgerät, Minishaker, MS 2 (Fa. IKA Labortechnik)
- Konstantraum, 15 ± 1 °C, Photoperiode 16 zu 8
- Kryomühle (Fa. SPEX CertiPrep, Typ: Freezer Mill 6800)
- Kühlschrank, -25 °C (Fa. Liebherr)
- Kunststoffhälterungsbottich (Innendurchmesser 60 cm, Höhe 38 cm)
- Lichtbrutschrank (Fa. Rubarth Apparate GmbH, Typ 3501)
- Membranpumpen (Fa. WISA, Typ 300)
- Messkoffer Multi 340 i / Set (Fa. WTW), Leitfähigkeitssonde Tetra Con 325, pH-Sonde Sen Tix 41, Sauersoffsonde Cell Ox 325
- Pipetten und Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 10µl (Fa. Eppendorf)
- Polystyrolröhrchen 12 x 75 mm 5 ml (Fa. Becton Dickinson, Bestell-Nr. 352054)
- Silikonschläuche und Verbindungsstücke, diverse Größen
- Spatel und Drygalskispatel
- Spritzen, steril, 2 ml (Fa. VWR Bestell-Nr. 6120108)
- Pasteurpipetten
- Petrischalen
- Plastikgefäße mit Deckel 1 I, (Fa. Pfefferkorn)
- Präparationsbesteck
- Spektralphotometer (Fa. Dr. Lange, Typ 50 S),Spektralphotometer (Fa. Unicam, Typ Helios)
- Sprudelsteine, diverse Fabrikate
- Standflaschen, 6 I, Erlenmeyerkolben, 3 I aus Borosilikatglas
- Standzylinder, 1 l, skaliert

- Trockenschrank, 60 °C (Fa. Heraeus, Typ: UT12)
- Vollglas-Aquarien (Höhe 30 cm, Breite 25 cm, Länge 40 cm).
- Waagen (Fa. Sartorius, diverse Fabrikate)
- Zellzählgerät, Coulter Counter Multisizer 3 (Fa. Beckmann Coulter GmbH)

Chemikalien und Lösungen

- CH₃HgCl (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. 442534-5g-A); M=251,08 g/mol
- NiCl₂ x 6H₂0 (Fa. Riedel de Haen, Nr. 13613); M=237,7 g/mol
- Agar für Plattierungsversuch
- 0,25 g Pepton (Fa. Difco), 0,25 g Hefeextrakt, 0,125 g K₂HPO₄, (Fa. Merck) 0,05 g MgSO₄ x 7 H₂0 (Fa. Merck) und 4 g Agar in 25 ml Anodonten-Puffer
- <u>Anodonten-Puffer</u> (Chemikalien von Fa. Merck) (KH₂PO₄ 0,3135 g/l; Na₂HPO₄ 1,38 g/l; NaCl 0,5 g/l KCl 0,746 g/l jeweils in Aqua bidest.)
- <u>limnisches Rekonstitutionswasser</u> (Chemikalien von Fa. Merck) nach [106] (MgSO₄ x 7H₂0, 0,123 g/l; CaCl₂ 0,22 g/l; KCl 0,0055 g/l; NaHCO₃ 0,063 g/l jeweils in deionisiertem Wasser), die Aufbewahrung erfolgt als 160 x konzentriertere Stocklösung der Einzelkomponenten.

2.3.1 Klassifizierung und Herkunft der Testorganismen

Linné beschrieb 1758 die beiden verwendeten Muschelarten *Anodonta cygnea* und *Anodonta anatina*, die zur Gattung der Anodonten gehören, da sie weder Schloss noch Zähne besitzen (griech. an = ohne; odontos = Zahn).

Klassifizierung:

Stamm: Mollusca (Weichtiere) Klasse: Bivalvia (Zweischaler) Ordnung: Schizodonta Gattung: Anodonta Familie: Unionidae Art: Anatina oder Cygnea





Abb. 14 und 15: Anodonta anatina (links) und Anodonta cygnea (rechts)

Beide Arten unterliegen Formvariabilitäten und können in Deutschland parallel vorkommen, so dass eine Unterscheidung oft nur anhand mehrerer Merkmale gelingt. Die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale wurden aus [107] in Tab. 5 zusammengefasst.

Art	Schalen-	Innenschale	Wirbelskulptur	Einstromöffnung
	Habitus		ľ	
Anodonta	rhombisch-	stumpf weißgrau	Fältchen der	breit mit kurzen
anatina	eiförmig,	oder glänzend,	Wirbelskulptur	Papillen
	Schild drei-	Unterrand verdickt	kreuzen die An-	
	eckig gewin-		wachsstreifen	
	kelt			
Anodonta	länglich-	perlmuttglänzend,	Fältchen der	schmal mit langen
cygnea	eiförmig,	Unterrand nicht	Wirbelskulptur	Papillen
	Schild kaum	verdickt	parallel zu An-	
	ausgeprägt		wachsstreifen	

Tab.	5: Unterscheidungsmerkmale vor	Anodonta anatina und	Anodonta cygnea
			,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,

Für den Aufbau einer Labor-und Rheinwasserhälterung wurden Bezugsquellen gewählt, die einen möglichst unbelasteten Zustand der Anodonten gewährleisten sollten.

Herkunft der Testorganismen

Die ersten beiden Muschellieferungen im Jahr 2005 wurden vom Bayrischen Landesamt für Wasserwirtschaft bezogen und überwiegend zum Methodenaufbau verwendet. Für weitere Untersuchungen wurde eine kommerzielle Bezugsquelle ausfindig gemacht und seitdem genutzt. Es handelt sich um eine Fischköderzuchtteichanlage in der Nähe von Flensburg, in deren Teichbesatz auch Anodonten vorkommen. Die erhaltenen Teichmuscheln wurden zu über 85% der Art *Anodonta anatina* zugeordnet, mit der alle Laborversuche sowie Expositionsversuche, aber auch die saisonalen Rhythmen in der Rheinwasserhälterung untersucht wurden. Die Altersspanne der Versuchstiere lag zwischen 5 und 10 Jahren, die anhand der Jahresringe bestimmt werden konnte, und es lag ein nahezu ausgewogenes Geschlechterverhältnis vor.

Bezugsquelle 1:	Bezugsquelle 2:
Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft	Foerdefisch
Versuchsanlage Wielenbach	Holger Eske
Demollstraße 31	Schulkoppel 12
82407 Wielenbach	24941 Jarplund-Weding

Die Entenmuscheln der Bezugsquelle 2 zeichneten sich durch ein höheres Gewicht und Körpervolumen bei vergleichbarem Alter aus (nicht gezeigte Daten) und waren für Expositionsversuche geeigneter.

2.3.2 Erfassung der biometrischen Daten

Körpermaße

Länge, Breite und Höhe der Muscheln wurden mit einem Lineal an den Stellen der Muscheln erfasst, an denen die Körpermaße maximal sind. Ungleichmäßigkeiten der Form wurden zusätzlich notiert.

Gewicht

Das Gewicht der Muscheln wurde durch eine Doppelbestimmung ermittelt. Die Muscheln wurden dazu direkt aus dem Hälterungswasser entnommen. Um Gewichtseinflüsse durch anhaftendes Hälterungswasser zu minimieren, wurden die Muscheln für ca. 3-5 s in Längsrichtung nach unten gerichtet und vor der Wägung kurz mit Vliespapier abgetupft. Da vitale Muscheln auch bei geringen Berühungen mit Schalenschlussreflex reagieren, war bei der Messung der Peribronchialraum mit Wasser gefüllt.

Volumen

Das Volumen der Muscheln wurde durch Wasserverdrängung der Muscheln in einem 600 ml Becherglas bestimmt. Der Überlauf des Becherglases wurde durch einen Schlauch aufgefangen, der direkt an der Überlaufnase des Becherglases mit Klebeband befestigt wurde. Vor dem Eintauchen der Muscheln wurde das Becherglas durch Zugabe von Wasser zum Überlaufen gebracht, bis das abfließende Wasservolumen am Schlauch versiegte. Die Muscheln wurden direkt aus dem Hälterungswasser entnommen und kurz mit Vliespapier abgetupft, damit während des Einsetzens keine Wasseraufnahme der Muscheln erfolgen konnte. Beim Einsetzen der Muscheln wurde darauf geachtet, dass diese langsam und in Längsrichtung eingesetzt wurden, um ein unkontrolliertes Überlaufen des Wassers zu verhindern. Der Wasserablauf wurde am Ende des Schlauches durch ein 50 ml Falcon-Tube aufgefangen und ausgewogen. Die Muscheln sanken durch ihre gegenüber dem Wasser höhere spezifische Dichte auf den Boden des Becherglases und verdrängten das Volumen an Wasser, welches ihrem eigenem Volumen entsprach. Da die Dichte des Wassers ca. 1 g/cm³ beträgt, konnte das Gewicht des aufgefangenen Wasservolumens direkt in ein Volumen der Muscheln umgerechnet werden. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.



Körpermaße der Entenmuschellieferungen aus Wielenbach



Korrelation von Gewicht und Volumen





2.3.3 Hälterung der Entenmuscheln

2.3.3.1 Rheinwasserhälterung der Entenmuscheln

Hälterungsbedingungen der Rheinwasserhälterung

Da die Futteralgenzucht (Desmodesmus subspicatus), die für eine dauerhafte Laborhälterung der Entenmuscheln notwendig ist, zeitaufwändig ist, wurde der Großteil der Teichmuscheln in die Rheinwasserhälterung übernommen. Im alten Dienstgebäude der Bundesanstalt für Gewässerkunde (Kaiserin-Augusta-Anlagen 15, 56068 Koblenz) befindet sich eine Gewässergütemessstation, an deren Zulauf die Muschelhälterung angeschlossen war. Die Muscheln wurden in Dunkelheit in einem Kunststoffbottich mit einem Innendurchmesser von 60 cm und einer Höhe von 38 cm vorgehältert, bevor sie für die Laborhälterung zum Einsatz kamen. Der Bottich wurde mit einem Rheinwasserzufluß von 14 l/min versorgt und hatte in der Mitte ein Ablflussrohr (Innendurchmesser ca. 6 cm), welches bei einer Wasserhöhe von ca. 35 cm den Abfluss des Rheinwassers gewährleistete. Der Zufluss wurde hoch eingestellt, weil er erstens die hohen Strömungsgeschwindigkeiten des Rheins simulieren und zweitens die Nahrungsversorgung von 40 bis 100 Muscheln, in diesem vergleichsweise kleinen Behälter, mit einem Wasservolumen von ca. 98 I sicherstellen sollte. Bei einem Zuflussstrom von 14 I/min fließt täglich ein Volumen von ca. 20160 I ab, d.h. das Wasser wurde theoretisch pro Tag mehr als 205fach ausgetauscht. Nimmt man eine Filtrationsleistung der Entenmuscheln von 0,36 l/(g x h) an [108], so errechnet sich bei einem Feuchtgewicht zu Trockengewichtsverhältnis von 9,78 und einem mittlerem Lebendgewicht von 36,6 g eine mittlere Filtrationsleistung von 1,347 l/h pro Individuum. Geht man von der maximalen Besetzungsdichte von 100 Muscheln aus, so können 3233 l/d von den Muscheln filtriert werden. Der Wasseraustausch ist also mindestens 6,2fach höher als das filtrierte Wasservolumen bei Maximalbesetzung. Die Dichte der Teichmuschelhälterung sollte also nur geringen Einfluss auf die Wasserqualität besitzen und simuliert damit eine natürliche Rheinwasserhälterung. Um auch bei Zuflussausfall eine Sauerstoffversorgung der Anodonten zu gewährleisten, wurde eine elektrische Belüftung durch eine Aquarienpumpe (Rena Air 100, Fa. Rena) zusätzlich eingesetzt. Eine Kontrolle des Zulaufs fand wöchentlich statt. Die chemisch-physikalische Wassergualität wurde zu den Entnahmezeitpunkten der Anodonten anhand der Messparameter pH-Wert, Temperatur, Leitfähigkeit und Sauerstoffgehalt dokumentiert. Der Chlorophyllgehalt im Rhein konnte mit der Biomasse an Algen und dem Wachstumsverhalten einer anderen limnischen Muschelart (Dreissena polymporpha) korreliert werden [109] und diente als Maß für die Futterversorgung der Anodonten in der Rheinwasserhälterung. Der mittlere Gesamtchlorophyllgehalt des Rheinwassers im Jahresgang 2006 lag bei 7,34 µg/l (siehe Abb. 139 in Kap. 3.5.2). Es konnten in der Rheinwasserhälterung trotz mehrmaliger Hämolymphentnahmen der Muscheln keine signifikanten Gewichtsabnahmen der Muscheln festgestellt werden (nicht gezeigte Daten). Die erfassten biotischen und abiotischen Faktoren der Rheinwasser-hälterung im Jahresgang 2006 sind den Ergebniskapiteln 3.5.1 und 3.5.2 zu entnehmen.

Messung des Gesamtchlorophyllgehaltes

Die Messung des Gesamtchlorophyllgehaltes erfolgte fluorimetrisch mit einem Algentoximeter, welches an den gleichen Zufluss der Rheinwasserhälterung der Muscheln angeschlossen war. Es handelt sich um ein Toximeter, welches Messlicht amplitudenmoduliert mittels Leuchtdioden bei 5 kHz und bei einer Wellenlänge von 590 nm emittiert und Chlorophyllmoleküle zur Fluoreszenz anregt. Ein Photomultiplier misst das Fluoreszenzlicht und erzeugt eine Spannungsänderung, die über die Funktion eines empirisch ermittelten Eichfaktors eine Berechnung des Gesamtchlorophyllgehaltes zulässt. Zusätzlich kann das Algentoximeter durch die Verwendung von aktinischem Licht (660 nm Wellenlänge, 1 Hz Taktfrequenz) auch den Lebendchlorophyllgehalt von Proben bestimmen, indem Teile des Photosystems II der Algen angeregt werden und Fluoreszenzlicht emittieren. Über die Zugabe von definierten Mengen einer Algensuspensionskultur können Schwankungen des Lebendchlorophyllgehaltes in einer Reaktionskammer erfasst werden und algentoxische Wirkungen kontinuierlich angezeigt werden.

Entnahme von Entenmuscheln aus der Rheinwasserhälterung

Im Jahresgang 2006 wurden zu 29 Zeitpunkten je 6 Individuen aus der Rheinwasserhälterung zur Bestimmung von saisonalen Rhythmen der Phagozytoseaktivität und der vitalen Hämozytendichte entnommen (siehe Kap. 3.5.2). Dabei wurde das minimale Punktionsintervall von 3 Wochen für eine vollständige Regeneration der vitalen Hämozytendichten und der Phagozytoseaktivität berücksichtigt (siehe Kap. 3.1.4.4). Die Muscheln wurden nach der Punktion am gleichen Tag in die Rheinwasserhälterung zurückgesetzt. Für größere Expositionsversuche wurden die benötigten Entenmuscheln für mindestens 3 Wochen in eine Laborvorhälterung überführt. Die generierten Daten aus Rheinwaser-, Labor- und Expositionshälterung beziehen sich aussschließlich auf die Art *Anodonta anatina*, obwohl keine signifikanten Abweichungen zwischen beiden Arten in den gemessenen Immunparametern gefunden werden konnten.

2.3.3.2 Laborhälterung der Entenmuscheln

Laborhälterung in limnischem Rekonstitutionswasser

Die Hälterung der Entenmuscheln wurde in 30 I Vollglasaquarien in 10 I limnischem Rekonstitutionswasser nach [106] bei einer Raumtemperatur von 22 \pm 3 °C und im Konstantraum bei 15 \pm 1 °C durchgeführt. Die Belüftung erfolgte elektrisch mit Membranpumpen, die Luft wurde über Sprudelsteine dem Hälterungswasser zugeführt. Die Individuendichte lag zwischen 4 und 12 Individuen pro Aquarium. Normalerweise wurden 4 Individuen pro Aquarium eingesetzt; nur zu Vorhälterungszwecken für Expositionsversuche wurde die Individuenzahl erhöht. Im Abstand von 7 Tagen fand ein 40%iger Wasseraustausch statt. Die chemischphysikalische Wasserqualität wurde mit den Messparametern pH, Temperatur, O₂-Gehalt und Leitfähigkeit überprüft. Der Ammoniumgehalt wurde stichprobenhaft vor dem Wasserwechsel bestimmt. Kam es zum Tod eines Versuchtieres, welches durch Ausbleiben des Schalenschlussreflexes angezeigt wurde, so wurde ein kompletter Wasserwechsel durchgeführt. Die Fütterung der Versuchstiere erfolgte mit einer Algensuspension von *Desmodesmus subspicatus* nach erfolgtem Wasserwechsel.

Hälterung über Quarzsandkörpern

Eine Hälterung der Entenmuscheln über einem Quarzsandkörper erwies sich als unpraktikabel, es kam in vergleichbaren Hälterungsintervallen häufiger zu Ausfällen der Testorganismen. Dabei wurden je 8 kg Quarzsand pro Aquarium verwendet und vor dem Einsatz mit limnischem Rekonstitutionswasser für 24 h bei 10 U/min in Überkopfschüttelung gewaschen. Der Quarzsand wurde von der Quarzwerke GmbH Frechen bezogen, die mittlere Korngröße betrug 0,16 mm, SiO₂-Gehalt > 99%. Es fand eine Qualitätskontrolle der Zusammensetzung nach DIN 4226 statt. Da das Quarzsandmaterial neben einer feinen Körnung herstellungsbedingt scharfkantige Oberflächen aufwies, kann es zu Schädigungen der Organismen bei der Filtration gekommen sein.

Die Fütterungsbedingungen in der Laborhälterung

Die Fütterung der Entenmuscheln erfolgte mit Grünalgen der Art *Desmodesmus subspicatus*. Das Wachstum der Grünalgen kann in Bringmann-Kühn-Lösung erfolgen. Die Zelldichtenbestimmungen können mikroskopisch, über Zellzählgeräte, photometrisch oder fluorimetrisch erfolgen. Die folgende Abbildung zeigt die enge Korrelation zwischen der optischen Dichte bei 600 nm und der Zellzahlbestimmung mit dem Coulter-Counter (Kapillaröffnungsweite 50 µm, Messvolumen 500 µl, Probenvolumen 100 µl und 10 ml Isoton II).



Abb. 18: Korrelation zwischen OD₆₀₀ und Coulter-Counter Messungen bei *Desmodesmus subspicatus*. Der mittlere Vk der Zellzählungen als Doppelbestimmung liegt bei 1,7%.

Die Algen kommen in der logarithmischen Wachstumsphase vereinzelt vor und haben bei ca. 5 µm Zellgröße ein Peakmaximum in der Coulter Counter Messung. Die photometrische Messung wurde zur Einstellung der Algendichte in der Laborhälterung der Muscheln bevorzugt.

Herstellung der Bringmann-Kühn-Lösung

Stammlösungen

(1) NaNO ₃	49,6 g/l
(2) K ₂ HPO ₄	3,9 g/l
(3) MgSO ₄ x 7 H ₂ 0	7,5 g/l
(4) CaCl ₂ x 2 H ₂ 0	3,6 g/l
(5) EDTA Na ₂ (Titriplex)	1 g/l
(6) Zitronensäure	0,3 g/l
(7) Eisen(III)-Citrat (-Hydrat) (etwa 19% Fe),	0,3 g/l
löst sich erst beim Autoklavieren, Flasche mit Aluminiumfolie umwickeln	
(8) Spurenelement-Lösung	
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,040 g/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ 0	0,024 g/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ 0	0,080 g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ 0	0,220 g/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ 0	1,810 g/l
H ₃ BO ₃	2,860 g/l

4 ml der Spurenelement-Lösung wurden mit Aqua Bidest auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösungen 1 bis 8 wurden autoklaviert und bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt.

Anzuchtlösung

Je 10 ml der Lösungen 1 bis 7, sowie 1 ml der Lösung 8 werden auf 1 l mit Aqua bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden unter sterilen Bedingungen 0,046 g/l an NaHC0₃ zugegeben und das Volumen mit deionisiertem Wasser auf 1I eingestellt.

Anzuchtsbedingungen der Algensuspension

Durch Zugabe von 50 ml einer vorher gewachsenen Stammkultur in Bringmann-Kühn-Lösung wird das Wachstum gestartet. Die Anzucht der Grünalgen erfolgte in Lichtbrutschränken Rumed Typ 3501 bei 22 °C unter Dauerlicht in 3 I Erlenmeyerkolben oder 6l Standflaschen in Bringmann Kühn Lösung; eine Belüftung erfolgte elektrisch durch eine Aquarienpumpe. Die Beleuchtung wurde durch 4 Osram Leuchtstoffröhren vom Typ L36 W12-950 gewährleistet. Nach ca. 10-14 Tagen Wachstumsdauer erreichen die Grünalgen eine optische Dichte zwischen 0,7-1,0 bei 600 nm. Die Algen können mehrere Wochen bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden, der TOC-Gehalt nimmt bei zweiwöchiger Lagerung nur geringfügig ab [110].

Fütterung der Entenmuscheln

Die Fütterung der Entenmuscheln erfolgte mit der hochgewachsenen Algensuspension von *Desmodesmus subspicatus,* deren optische Dichte bei 600 nm jeweils nach dem wöchentlichem Wasserwechsel photometrisch bestimmt wurde. Mehr als dreimonatige Laborhälterungen der Muscheln bei einer Raumtemperatur von 22 ± 3 °C konnten mit folgender Faustformel zur Berechnung der Futtermenge gewährleistet werden.

Berechnung der Futtermenge pro Aquarium

 $V_{(Algensuspension / Woche)} = 1/OD_{600nm}$ der Algensuspension x 350 ml x durchschnittliches Gewicht der Testorganismen / 36,6 g x Anzahl der eingesetzten Individuen.

Bei Verwendung dieser Futtermenge blieb der Ammoniumgehalt bis zum Wasserwechsel innerhalb der Wassergüteklasse II, was weniger als 0,3 mg/l Ammonium entspricht. Die Messung des Ammoniumgehaltes wurde mit dem Ammoniumtest LCK 304 durchgeführt. Die Messung erfolgte mit dem Dr. Lange Spektralphotometer 50 S. Empfindlichkeit: 0,015 – 2,0 mg/l NH₄-N und 0,02 - 2,5 mg/l NH₄.

2.2.3.3 Expositionshälterung der Entenmuscheln mit Referenzsubstanzen

Exposition von Muscheln mit Referenzsubstanzen

Vor den Expositionsversuchen wurden die Entenmuscheln für 3 Wochen im Labor bei Raumtemperatur 22 ± 3 °C in 30 I Vollglasaquarien gehältert. Eine Individuendichte von 12 Testorganismen pro Aquarium wurde nicht überschritten. Die Exposition der Muscheln erfolgte in 11 Plastikgefäßen (Fa. Pfefferkorn) in 0,7 I Hälterungswasser (limnischen Rekonstitutionswasser).



Abb. 19 und 20: Versuchsaufbau der Muschelexpositionsversuche

Ausgehend von den *In vitro*-Schwellenwertkonzentrationen (siehe Kap. 3.2.2) wurden Expositionszenarien für die stärkste (CH₃HgCl) und schwächste phagozytosehemmende Substanz (NiCl₂) bei einem 1/100; 1/1000 und 1/10000 der *In vitro*-Nachweisgrenze generiert (siehe Tab. 6). Der Expositionsversuch wurde in 2 x 3 Reihen mit je 6 Gefäßen angelegt. Je 4 Entenmuscheln wurden einem Expositionsintervall zugeordnet. Die Expositionsintervalle lagen bei 1d, 3d, 7d und 14 d bei 22 \pm 3 °C. Der Wasserwechsel der Hälterungsgefäße erfolgte täglich.

Die Muscheln wurden langsam in das Hälterungswasser mit der Einstromöffnung nach unten eingeführt. Die Belüftung der Expositionsgefäße erfolgte elektrisch über Membranpumpen, dabei wurde die Luft über Pasteurpipetten dem Hälterungswasser zugeführt. Eine Fütterung der Entenmuscheln fand während der Exposition nicht statt. Nach den Expositionsintervallen wurden die Versuchtiere punktiert und die Hämolymphe für Messungen der Phagozytoseak-tivität und der vitalen Hämozytendichten verwendet (siehe Kap. 2.4.1 und 2.4.3). Die exponierten Muscheln wurden auf Bioakkumulationen untersucht (Kap. 2.3.5).

Bedingung	Anzahl der lebenden Versuchstiere zu den Versuchszeitpunkten			chstiere zu den kten		
	Beginn	1	3	7	14	Ende
		d	d	d	d	
Kontrolle limnisches Rekonstitutions-	16	4	4	4	4	16
wasser						
CH₃HgCl 0,425 µg/l	16	4	4	4	4	16
CH₃HgCl 4,25 µg/l	16	4	4	4	4	16
CH₃HgCl 42,5 µg/l	16	4	4	4	4	16
Kontrolle limnisches Rekonstitutions-	16	4	4	4	4	16
wasser						
NiCl ₂ 61,4 μg/l	16	4	4	4	4	16
NiCl ₂ 614 µg/l	16	4	4	4	4	16
NiCl ₂ 6,14 mg/l	16	4	4	4	0	12

Tab.	6: Expositionsbedingungen	der Referenzsubstanztestunge	'n
	e. Expectation of a light gen	der i tererenzeabetanzteetange	

2.3.3.4 Expositionhälterung der Entenmuscheln mit Abwasserproben

Herkunft der Abwasserproben

Insgesamt 4 Abwasserproben kamen aus einer kommunalen und einer industriellen Kläranlage und wurden vom Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen (LANUV-NRW) zur Verfügung gestellt. Bei den industriellen Abwässern handelte es sich um schwermetallbelastete Abwässer einer Metall verarbeitenden Industrie, die sich aus Zu- und Ablauf der industriellen Kläranlage zusammensetzte. Die kommunalen Abwässer setzten sich aus Zu- und Ablauf einer Versuchskläranlage zusammen, in der kommunales Abwasser mit ca. 5,5 mg/l Carbamazipin dotiert. Die Proben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Stock und Frau Selke (LANUV-NRW) zur Verfügung gestellt.

Voruntersuchungen der Abwasserproben

Bevor eine Exposition der Muscheln in Abwasser erfolgte, wurden die Abwasserproben auf allgemeine toxische Potenziale mit der limnischen Biotestpalette der Bundesanstalt für Gewässerkunde untersucht. Diese umfasst 3 genormte Testverfahren mit Vertretern der trophischen Ebenen. Der Großteil der Proben wurde bis zu seiner Verwendung kühl bei 4 °C gelagert, jeweils 500 ml der Proben wurden für den Einsatz in der Biotestpalette neutralisiert. Die Testungen wurden von Frau Ilona Kirchesch und Frau Stefanie Wunsch im Referat Ökotoxikologie/Biochemie der Bundesanstalt für Gewässerkunde durchgeführt.

Zusammensetzung der limnischen Biotestbatterie

Produzenten: Algentest (Desmodesmus subspicatus) nach DIN 38412-L33 [111]



Abb. 21: Aufnahme von Desmodesmus subspicatus in der Zählkammer

Konsumenten: Daphnien (Daphnia magna) nach DIN 38412-L30 [112]



Abb. 22: Photo von Daphnia magna

Destruenten: Leuchbakterientest (Vibrio fischeri) nach DIN EN ISO 11348-3 [113]





Abb. 23 und 24: Mikroskopische Aufnahmen von Vibrio fischeri

Die Abbildungen wurden durch Dr. Falk Krebs und Steffen Wahrendorf (BfG) zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der Biotestungen sind aus Abb. 121 im Kap. 3.4.1 zu entnehmen.

Berechnung des pT- Wertes

Die Auswertung der Probentestungen erfolgte durch die pT-Wert-Methode nach Krebs [114]. Der pT-Wert (*potentia toxikologiae* = toxikologischer Exponent) gibt an, wie oft eine Probe 1 zu 2 verdünnt werden muss, damit im Testystem kein toxischer Effekt mehr nachzuweisen ist. Je höher der pT-Wert, desto höher ist das toxische Potenzial im Testgut. Der pT-Wert ist der Exponent zur Basis 2, der der Verdünnungsstufe entspricht, bei der kein toxischer Effekt mehr nachgewiesen werden kann. Als Grundlage wird ein Hemmwert kleiner 20% benutzt.

Im aufgeführten Beispiel ist erst bei einer Verdünnungsstufe von 16 im Testsystem kein Effekt mehr nachzuweisen, es resultiert ein pT-Wert von 4.

$$2^{pT} = 16$$

pT x log 2 = log 16
pT = log16 / log 2
pT = 4

Ausgehend von den niedrigsten nichteffektiven Verdünnungstufen des sensitivsten Testorganismus wurden die Zu- und Ablauf der Abwasserproben nochmals um den Faktor 2 für den Muschelexpositionsversuch mit deionisiertem Wasser verdünnt. Die Probenpaare des kommunalen Abwassers wurden 1 zu 8 und die Probenpaare des industriellen Abwassers 1 zu 64 verdünnt. Bei pH-Abweichungen vom Bereich 7,5 ± 1 wurde der pH-Wert auf 7,5 ± 0,5 mit 2 molarerer HCI oder NaOH eingestellt Die essentiellen Salze wurden auf die Konzentration des limnischen Rekonstitutionswassers substituiert.

Probenkennung	Orio	ginalproben	nach N für die Biote	eutralisation e limnische estbatterie	nach Verdünnung und Aufsalzen für den Muschel- expositionsversuch	
	pH-	Leitfähigkeit	pH-	Leitfähigkeit	pH-	Leitfähigkeit
	Wert	in mS/cm	Wert	in mS/cm	Wert	in mS/cm
Zulauf kom.	8,43	1,14	7,01	1,25	7,19	0,84
Abwasser						
Ablauf kom.	8,38	1,10	6,93	1,30	7,59	0,83
Abwasser						
Zulauf ind.	10,2	59,10	7,10	59,70	7,04	1,97
Abwasser						
Ablauf ind.	8,22	59,50	7,10	62,30	8,29	2,09
Abw.						

Tab. 7: Chemisch physikalische Messparameter der Abwasserrpoben vor und nach den Probenbehandlungen für die Bioteste.

Auffällig waren die hohen Salzgehalte im industriellen Abwasser, die aber dennoch mit der limnischen Biotestpalette untersucht worden sind, da toxische Effekte in einem limnischen Bezugssystem untersucht werden sollten. Die gemessenen Effekte der Biotestpalette setzen sich daher aus Salintätseinfluss und Schadstoffwirkung zusammen.

Muschelexpositionsansatz mit verdünnten Abwasserproben

Es wurde der gleiche Expositionsaufbau wie in Kapitel 2.2.3.3 verwendet. Jeweils 6 Entenmuscheln vergleichbarer Größe und Alters wurden unter 6 Bedingungen für 2 Wochen bei 22 \pm 3 °C exponiert.

Expositionsbedingungen der Abwasserexpositionen

- 1) Negativkontrolle, limnisches Rekonstitutionswasser
- 2) Zulauf kommunales Abwasser, in der Verdünnungstufe 1 zu 8
- 3) Ablauf kommunales Abwasser, in der Verdünnungstufe 1 zu 8
- 4) Zulauf industrielles Abwasser, in der Verdünnungstufe 1 zu 64
- 5) Ablauf industrielles Abwasser, in der Verdünnungstufe 1 zu 64
- 6) Positivkontrolle, 1,1 mg/l NiCl₂ in limnischem Rekonstitutionswasser

Der Wasserwechsel fand täglich statt; eine Fütterung der Entenmuscheln erfolgte während der Exposition nicht. Nach den Expositionsintervallen wurden die Versuchstiere punktiert und die Hämolymphe für Messungen der Phagozytoseaktivität und der vitalen Hämozytendichten, der ROS-Produktion und der Vitalität der Hämozyten nach dem Phagozytoseansatz untersucht. Bis auf die vitale Hämozytendichte wurden die Messparameter im Vierfachansatz pro Individuum erhoben und statistisch ausgewertet.

2.3.4 Statistik der Expositionsmessparameter

Prozentuale Variationskoeffizienten (Vk)

Der Variationskoeffizient ist eine statistische Kenngröße. Er ist definiert als die relative Standardabweichung, d.h. die Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert einer Zufallsvariablen X. In der Regel wird der Variationskoeffizient in Prozent angegeben.

Box-Plots

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte über Box-Plots. Box-Plots fassen verschiedene Maße der zentralen Tendenz, Streuung und Schiefe der Datenverteilung in einem Diagramm zusammen. Als Box wird das durch Quartile bestimmte Rechteck bezeichnet. Es umfasst 50% der Daten vom 25% Percentil bis zum 75% Percentil. Die Linie innerhalb der Box gibt den Median an. Oberhalb und unterhalb der Box befinden sich Whiskers (Fehlerbalken) die das 90%ige Quantil und das 10%ige Quantil anzeigen. Werte die ausserhalb dieser Whiskers liegen wurden nicht eliminiert und sind als Extremwerte mit Punkten gekennzeichnet.

Statistik der Auswertung

Alle erhobenen Messdaten aus den Expositionversuchen wurden mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test gegenüber den Negativkontrollen getestet. Das Testverfahren ist das verteilungsunabhängige Gegenstück zum parametrischen t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte stetiger Verteilungsfunktionen [115]. Voraussetzungen für den U-Test sind zumindest ordinal skalierte Zahlenwerte (Ränge) und eine ähnliche bis gleiche Verteilungsform. Der U-Test reagiert auf Unterschiede der Rangsummen von unabhängigen Stichproben. Dazu mussten die Einzelmesswerte aus den Mehrfachbestimmungen der Individuen mit verwendet werden. Die Mann-Whitney-U-Ergebnisse befinden sich im Anhang; weitere Informationen über die Verwendung dieses statistischen Verfahrens befinden sich im Diskussionsteil in Kap. 4.3.3.

Statsitik für Varianzungleichheit

Eine statistische Bestimmung der Varianzhomogenität wurde mit dem Levene Test durchgeführt. Für jede abhängige Variable wurde eine Varianzanalyse für die Werte der absoluten Abweichungen von den entsprechenden Gruppenmittelwerten durchgeführt. Bei einer statistisch signifikanten Abweichung im Levene-Test war, wurde die Hypothese homogener Varianzen abgelehnt.

2.3.5 Bioakkumulationsuntersuchungen nach Muschelexposition mit Referenzsubstanzen

Das bioakkumulative Potenzial der exponierten Versuchstiere sollte zu den verschiedenen Expositionszeitpunkten untersucht werden. Damit sollte ermittelt werden, ob die gezeigten Immunmodulationen der Phagozytoseaktivität sich auch über das bioakkumulative Potenzial der Referenzsubstanzen abbilden lässt. Die exponierten Muscheln wurden nach der Exposition und nach erfolgter Punktion bei -25 °C eingefroren. Die Muscheln wurden zur Präparation des Weichkörpers bei Raumtemperatur aufgetaut.

Präparation der Muschelweichkörper

Die Muscheln wurden mit Leitungswasser gesäubert, um Algenreste und anderen Schmutz zu entfernen. Die Muschelschalen wurden mit einem Spatel geöffnet, hierzu wurde versucht, das flache Ende des Spatels zwischen die Muschelschalen zu schieben und die Schalen aufzuhebeln, der dadurch entstehende Spalt wurde mit einer Pipettenspitze gesichert. Mit einer Pinzette und einem Skalpell konnten die Mantellappen von den Schalen gelöst werden. Die Mantellappen wurden so weit gelöst, bis die Anheftstellen des vorderen und dann die des hinteren Schließmuskels zu erkennen waren und mit einem Skalpell durchtrennt werden konnten. Nachdem die Anheftungsstellen der Muskeln durchtrennt waren, konnte der Weichkörper der Muschel entnommen werden.

Einwaage der Muschelweichkörper

Die Gewebeteile wurden kurz auf Vliespapier gelegt und anschließend auf den Waagschalen eingewogen. Vor der Gefriertrocknung wurde das Gewebe für mindestens 8 h bei -25 °C eingefroren.

Gefriertrocknung

Die Aluminiumschalen wurden mit gelöcherten Deckeln bedeckelt. Die Haupttrocknung erfolgte bei 0,34 mbar für ca. 20 h. Ein Druckausgleich der Gefriertrocknungsanlage wurde durch langsames Öffnen des Magnetventils hergestellt. Die Gefäße mit Gewebeinhalt wurden anschließend ausgewogen, und der Inhalt wurde in der Kryomühle homogenisiert.

Homogenisation mit der Kryomühle

Die Homogenisationsgefäße wurden vor jeder Homogenisation ausgewaschen. Es erfolgte ein Bürsten mit Leitungswasser, Besprühen und Einwirken mit Meliseptol und ein Abwaschen mit deionisiertem Wasser. Die Gefäße wurden bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet.

Verwendung der Kryomühle

Das Gerät wurde eingeschaltet, und der Kühlbehälter wurde mit flüssigem Stickstoff befüllt. Die Homogenisationsgefäße wurden eingesetzt und verschlossen. Die Proben wurden für 5 min vorgekühlt und anschließend für 5 min bei der maximalen Schüttelstärke zerstoßen. Die Homogenisationsgefäße wurden nach dem Schüttelvorgang entnommen und der Gewebeinhalt wurde in geeignete Glasgefäße abgefüllt. Die Gewebeinhalte wurden im Exsikkator für 2 h auf Raumtemperatur akklimatisiert und anschließend ausgewogen. Die Homogenisationsgefäße wurden erneut gereinigt, dabei wurde in aufsteigender Konzentration zur Kontaminationsminimierung gearbeitet. Die folgende Abbildung zeigt die pulverisierten, kryogemahlenen Gewebehomogenate.



Abb. 25: Muschelgewebehomogenate nach dem Kryomahlen

2.3.5.1 Bestimmung von Nickel durch Atomabsorptionsspektrometrie nach elektrothermischer Atomisierung

Die im folgenden beschriebene Arbeitsanweisung der Schwermetallanalytik wurden vom Referat G2 der Bundesanstalt für Gewässerkunde durchgeführt und sind daher als methodisch abgeschlossene Einheiten dargestellt.

Anwendungsbereich

Das Verfahren ist geeignet zur Bestimmung von Nickel in Wasser in Massenkonzentrationen von 0,5 µg/l bis 20,0 µg/l. Höhere Konzentrationen können nach entsprechender Verdünnung, niedrigere durch ein Anreicherungsverfahren im Graphitrohr bestimmt werden. In Schlämmen, Sedimenten und biologischen Proben kann Nickel nach entsprechenden Aufschlussverfahren bestimmt werden.

Bezug zu gültigen Normen

In Anlehnung an DIN 38 406 - E11 - 2, 1992 [116]

Messprinzip

Die Messlösungen werden in ein elektrisch aufheizbares Graphitrohr injiziert, das sich in einem im Strahlengang eines Atomabsorptionsspektrometers eingebauten Graphitrohrofen befindet. Nach Trocknung, thermischer Vorbehandlung und Atomisierung der Probe wird deren Extinktion bei einer Wellenlänge von 228,8 nm gemessen.

Geräte

- AAS-Spektrometer ZEEnit 650 (Analytik Jena) mit ZEEMAN-Untergrundkompensation
- Graphitrohrofen mit querbeheiztem Graphitrohr (THGA-System) mit integrierter Plattform
- Probenautomat MPE 60
- Hohlkathoden-Lampe für Nickel
- Gasversorgung mit Argon
- Mikropipetten, Nennvolumen 100, 500 und 1000 µl
- Variopipette, Nennvolumen 0 bis 10 ml
- Messkolben, Nennvolumen 100 und 1000ml
- Probengefäße aus Polyethylen, Nennvolumen 1,8 ml

Chemikalien

Zum Spülen der Gefäße und zur Vorbereitung der Lösungen sind ausschließlich Wasser des Reinheitsgrades ultrarein (PURELABplus) und Chemikalien des Reinheitsgrades SUPRA-PUR oder speziell für die AAS-Analytik hergestellte Chemikalien zu verwenden.

- <u>Salpetersäure</u>, $\rho(HNO_3) = 1,40 \text{ g/l}$
- <u>Nickel-Stammlösung I</u>, ρ(Nickel) = 1000 mg/l Es wird eine handelsübliche Nickel-Standardlösung verwendet. Diese Lösung ist mit einem Mindest-haltbarkeitsdatum versehen.

<u>Nickel-Stammlösung II</u>, ρ(Ni) = 10 mg/I

1,0 ml der Nickel-Stammlösung I in einen 100 ml Messkolben pipettieren, 1 ml Salpetersäure zugeben und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur mindestens 1 Woche haltbar. Ausgehend von diesen Stammlösungen werden verschiedene Nickel Bezugslösungen hergestellt. Die Bezugslösungen sind unmittelbar vor Gebrauch herzustellen. Die Bezugslösungen enthalten 1 µg/l, bis 50,0 µg/l Nickel.

Blindwertlösung

In einen 100 ml Messkolben 1 ml Salpetersäure pipettieren und mit Wasser auffüllen. Muss die Probe aufgeschlossen werden, erfordert die Blindwertlösung die gleiche Vorbehandlung.

<u>Nullwertlösung</u>
Als Nullwertlösung Wasser verwenden.

Standardreferenzmaterial:

- Buffalo River Sediment SRM 2704, $c(Ni) = 44,1 \pm 3,0 \text{ mg/kg}$
- Buffalo River Sediment SRM 8704, $c(Ni) = 42.9 \pm 3.7 \text{ mg/kg}$
- Natural Water SRM 1640, $c(Ni) = 27.4 \pm 0.8 \ \mu g/l$
- Mussel Tissue SRM 2976, c(Ni) = 0,93 ± 0,12 mg/kg
- Internes Referenzmaterial IRR, $c(Ni) = 32,7 \pm 1,3 \text{ mg/kg}$
- Internes Referenzmaterial IRM, $c(Ni) = 123,4 \pm 2,5 \text{ mg/kg}$

Durchführung

Vorbehandlungsschritte

Bei der Probenahme sind grundsätzlich die Angaben in den Standardarbeitsanweisungen zur Probenahme zu beachten. In Sedimenten und Schwebstoffen wird Nickel nach Mikrowellen-Aufschluss mit Salpetersäure bestimmt.

Methodenparameter

Wellenlänge:	232,0 nm
Spalt:	0,2 nm
HKL:	5,0 mA
Magnetfeldstärke:	0,8 T
Graphitrohrtyp:	PIN-Plattform
Pyrolysetemperatur:	1100 °C
Atomisierungstemperatur:	2350 °C

Alle Parameter für Spektrometer, Eichung, Temperaturprogramm usw. sind in Messprogrammen in der WinAAS-Software gespeichert.

Kalibrierung

Vor der Messung sind die Bezugslösungen herzustellen. Die Kalibrierung erfolgt nach dem Standardkalibrierverfahren.

Messung

Das Spektrometer nach den Angaben in der Standardarbeitsanweisung "Betrieb des Spektrometers AAS ZEEnit 650" vorbereiten. Die Bezugs-, QC- und Messlösungen werden auf dem Probenautomaten MPE 60 platziert und vermessen. Von jeder Probe ist eine Doppelmessung durchzuführen.

Protokollierung der Rohdaten

Die Rohdaten werden in einer Datenfile direkt am Geräterechner abgelegt und zusätzlich in eine CSV-Datei importiert.

Prüfung und Ablage der Ergebnisse

- Prüfung der Blindwerte
- Prüfung der Ergebnisse des Standardreferenzmaterials auf Richtigkeit
- Prüfung auf Plausibilität
- Die geprüften Ergebnisse werden über die CSV-Datei in vorhandene Auswertungstabellen (EXCEL-Format) exportiert.

AQS-Maßnahmen

In jeder Messserie ist mindestens eine Blindwertbestimmung durchzuführen

In jeder Messserie ist zu Beginn ein Standardreferenzmaterial zu messen

Führen von Mittelwert-Kontrollkarten mit dem Standardreferenzmaterial

Verfahrenskenngrößen

Arbeitsbereich:	1 - 10 µg/l
Anzahl der Eichkonzentrationen N	10
Anpassungstest nach Mandel:	Die Kalibrierfunktion ist
	linear
Empfindlichkeit (Steigung a ₁)	0,005143
Blindwert (Achsenabschnitt a ₀)	0,001197
Reststandardabweichung sy	0,000407331
Verfahrensstandardabweichung sx0	0,079200762
Relative Verfahrensstandardabwei-	1,44%
chung	
Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645	0,93 µg/l
Bestimmungsgrenze im Feststoff	0,10 mg/kg

2.3.5.2 Bestimmung von Quecksilber durch Atomabsorptionsspektrometrie ohne Anreicherung

Die im folgenden beschriebene Arbeitsanweisung der Schwermetallanalytik wurden vom Referat G2 der Bundesanstalt für Gewässerkunde durchgeführt und sind daher als methodisch abgeschlossene Einheiten dargestellt.

Anwendungsbereich

Quecksilberverbindungen sind in natürlichen Wässern in nur geringer Massenkonzentration enthalten. Quecksilber kann dabei in organischen und anorganischen Verbindungen vorliegen. In Sedimenten kann sich Quecksilber anreichern. Nach dieser Arbeitsanweisung wird Quecksilber in allen Bindungsformen erfasst. Das Verfahren ohne Anreicherung ist geeignet für die Bestimmung von Quecksilber in Wässern und Aufschlusslösungen von Sedimenten, Böden und biologischen Proben im Konzentrationsbereich von 1,0 μ g/l bis 10,0 μ g/l. Nach Verdünnen der Probe können auch höhere Konzentrationen gemessen werden.

Bezug zu gültigen Normen

In Anlehnung an DIN EN 1483 Abschnitt 4: 1997 [117]

Messprinzip

Ein- oder zweiwertiges Quecksilber wird im sauren Medium durch Zinn(II)chlorid) zum Element reduziert, mit Hilfe eines Inertgases aus der Lösung ausgetrieben und als atomares Gas in eine Quarzküvette überführt. Die Extinktion wird bei einer Wellenlänge von 253,6 nm im Strahlengang eines Atomabsorptionsspektrometers bestimmt.

Geräte

Fließinjektions-Mercury-System FIMS-400 (PERKIN-ELMER) mit Strahlungsquelle für die Quecksilberbestimmung, peristaltischen Pumpen zum Transport von Probe, Trägerlösung, Reduktionsmittel, FIA-Ventil, TYGON-Verbindungsschläuchen, Gas-Flüssigkeitsseparator und Reaktionseinheit (Chemifold).

- Probenautomat AS-90 (PERKIN-ELMER)
- Gasversorgung mit Argon
- Messkolben, Nennvolumen 100 und 1000 ml
- Mikropipetten, Nennvolumen 100, 500 und 1000 µl
- Variopipette, Nennvolumen 1 bis 10 ml
- Dispenser
- Mikrowellen-Online-Aufschlussgerät MAXIDIGEST MX 350

Chemikalien

Als Chemikalien sind mindestens solche des Reinheitsgrades "zur Analyse" oder besonders quecksilberarme, als Wasser ist ultrapures (*PURELABplus*) oder Wasser gleichen Reinheitsgrades, zu verwenden.

- Salzsäure, HCl, ρ = 1,16 g/ml
- Salzsäure, HCl, [c] = 3%
- 100 ml Salzsäure werden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.
- Salpetersäure, HNO_{3, ρ} = 1,40 g/ml
- Zinn(II)-chlorid-Lösung 2,5%
- 25,0 g Zinn-(II)-chlorid, SnCl₂ x 2H₂O, in 100 ml Salzsäure lösen; die Lösung mit Wasser auf 1000 ml auffüllen. Diese Lösung muss arbeitstäglich frisch hergestellt werden.
- Kaliumchlorid-Lösung 20%
- 20,0 g Kaliumchlorid werden in 100 ml Wasser gelöst.
- Hydroxylammoniumchlorid-Lösung 12%
- 12 g Hydroxylammoniumchlorid, H₄CINO, werden in einen 100 ml Messkolben eingewogen, mit ca. 80 ml Wasser gelöst und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.
- Standardreferenzmaterialien
- Buffalo River Sediment SRM 2704, c(Hg) = 1,47 \pm 0,07 mg/kg
- Internes Referenzmaterial IRR, c(Hg) = $0,47 \pm 0,04$ mg/kg
- Mussel Tissue CRM 278, $c(Hg) = 0,188 \text{ mg/kg} \pm \text{ mg/kg}$
- Mussel Tissue SRM 2976, c(Hg) = 61,0 \pm 3,6 $\mu\text{g/kg}$
- 2-[(Ethylmercurio)thio]-benzoesäure Natriumsalz, (Thimerosal), C₉H₉HgNaO₂S
- Quecksilber-Stammlösung I, ß(Hg) = 1000 mg/l
- Es wird eine handelsübliche Quecksilber-Standardlösung verwendet. Diese Lösung ist mit einem Mindesthaltbarkeitsdatum versehen.
- Quecksilber-Stammlösung II, ß(Hg) = 1 mg/l
- 1,0 ml der Quecksilber-Stammlösung I unter Zugabe von 1 ml Salpetersäure und 1 ml Kaliumchloridlösung mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.1 ml dieser Lösung entspricht 1 µg Quecksilber.
- Quecksilber-Standardlösung (I), $\beta(Hg) = 100 \ \mu g/I$
- 10 ml der Quecksilber-Stammlösung II unter Zugabe von 1 ml Salpetersäure und 1 ml Kaliumchloridlösung mit Wasser auf 100 ml auffüllen. 1 ml dieser Lösung entspricht 100 ng Quecksilber. Die Lösung unmittelbar vor Gebrauch ansetzen.
- Quecksilber-Bezugslösungen Massenkonzentrationsbereich 1 bis10 µg/l
- In 3 Messkolben, Nennvolumen 100 ml, 1, 5 und 10 ml der Quecksilber-Standardlösung (I) pipettieren. Jeder Lösung 1 ml Salpetersäure und 1 ml Kaliumchloridlösung zufügen. Die Lösungen mit Wasser bis zur Marke auffüllen und durchmischen. Die Bezugslösungen enthalten 1, 5 und 10 µg/l Quecksilber. Diese Bezugslösungen sind vor jeder Messreihe anzusetzen.
- 10 ml Salpetersäure werden wie die Proben einem Mikrowellen induzierten Druckaufschluss unterzogen.
- Als Nullwertlösung ist Wasser zu verwenden.

Probenahme, -konservierung und -lagerung

Die Probenahme wird nach den Anweisungen der BfG-SOP "Probenahme von Wasser, Sediment, Schwebstoff und Biota" durchgeführt.

Sedimente, Schwebstoffe und Biota werden durch Gefrieren bei -25 °C konserviert.

Probenvorbereitung

Die gefriergetrocknete Probe wird nach der Korngrößenfraktionierung einem Mikrowellen induzierten Druckaufschluss mit Salpetersäure unterzogen. Zur Durchführung dieses Aufschlusses siehe die Standardarbeitsanweisung "Mikrowelleninduzierter Aufschluss mit Salpetersäure zur nachfolgenden Bestimmung des säurelöslichen Anteils von Schwermetallen". Zur Messung wird ein Aliquot dieses Aufschlusses von 6 ml mit 1 ml Hydroxylammoniumchlorid und 5 ml Wasser vermischt.

Durchführung

Geräteparameter:

Wellenlänge:	253,7 nm
Spalt:	0,7 nm
Signalmessung:	Peakhöhe
Messzeit:	20 s
Gasströmung:	80 ml Argon/min

Kalibrierung

Vor der Messung sind die Bezugslösungen herzustellen. Die Messung erfolgt nach dem Standardkalibrartionsverfahren.

Messung

Die einzelnen Geräte werden nach der Standardbetriebsanweisung "Messungen mit der Fließinjektions-Mercury-Atomabsorptionsspektrometrie ohne Amalgam-Zusatz" vorbereitet. Die vorbereiteten Bezugs- und Messlösungen werden auf dem Probenautomat AS 90 platziert und vermessen. Von jeder Probe ist eine Doppelmessung durchzuführen.

Protokollierung der Rohdaten

Die Rohdaten werden in Datenfiles direkt am Systemrechner abgelegt.

Prüfung und Ablage der Ergebnisse

- Prüfung der Blindwerte
- Prüfung der Ergebnisse des Standardreferenzmaterials auf Richtigkeit
- Prüfung auf Plausibilität
- Die geprüften Ergebnisse werden in vorhandene Datenbanken (EXCEL) eingetragen, bzw. übernommen.
AQS-Maßnahmen

- In jeder Serie sind Blindwerte mitzumessen
- Messung der Standardreferenzmaterialien bei jedem Messzyklus
- Führen von Mittelwertkontrollkarten

Verfahrenskenndaten

Arbeitsbereich:	1 - 10 µg/l
Anzahl der Eichkonzentrationen N	10
Anpassungstest nach Mandel:	Die Kalibrierfunktion ist
	linear
Empfindlichkeit (Steigung a ₁)	0,03353
Blindwert (Achsenabschnitt a ₀)	0,004073
Reststandardabweichung sy	0,0020399
Verfahrensstandardabweichung	0,0608304
Relative Verfahrensstandardabweichung	1,11%
Nachweisgrenze	0,21 µg/l
Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645	0,72 μg/l
Bestimmungsgrenze im Feststoff	0,10 mg/kg

2.3.5.3 Berechnung der Bioakkumulationsfaktoren

Die Berechnung des Bioakkumulationsfaktors erfolgte nach:

Bioakkumulationsfaktor = (Trockenmassekonzentration des Schwermetalls im Mischgewebe der exponierten Muscheln - Trockenmassekonzentration vom Mischgewebe nichtexponierter Muscheln) / nominale Expositionskonzentration des Schwermetalls

Es wurde die Grundbelastung an Schwermetallen von der Trockenmassekonzentration nach Exposition abgezogen, damit Vorhälterungsbedingungen im Rhein oder vom Herkunftsort nur geringen Einfluss auf die Berechnung des Bioakkumulationsfaktors besitzen. Gerade bei niedrigen Expositionskonzentrationen hätten sich sonst hohe Bioakkumulationsfaktoren errechnet, die nicht expositionsbedingt sind. Die Bioakkumulationsergebnisse sind in Kap. 3.3.4 und 3.3.5 dargestellt.

2.3.6 Hämolymphentnahme

Freilegung des vorderen Schließmuskels

Die Muscheln wurden aus der Hälterung entnommen und durch Abspülen mit Leitungswasser von Sedimentpartikeln befreit. Die Öffnung der Muschelschalen erfolgte durch Aufspreizung der Schalen mit den Fingern; dabei wurden die Fingernägel beider Daumen mittig in die Überlappungsstelle der Schalen geschoben. Die Schalen konnten nun langsam auseinander gezogen werden. Die Öffnung sollte langsam erfolgen, um Brüche des Schalenrandes oder Risse im Schließmuskelgewebe zu vermeiden. Bei größeren Organismen war es erforderlich, die Schalen mit einem flachen stumpfen Gegenstand aufzuhebeln, z.B. durch einen großen Spatel. Dabei war auf eine größere Auflagefläche zu achten, um Schalenbrüche zu vermeiden. Die Eindringtiefe wurde so gewählt, dass Gewebeverletzungen vermieden werden konnten. Der durch das Aufspreizen entstehende Spalt konnte durch das Einsetzen von zwei 1000 µl Eppendorf-Pipettenspitzen stabilisiert werden. Der spitze Teil der Pipettenspitzen wies dabei von der Muschel weg. Eine Pipettenspitze konnte nun in Richtung des vorderen Schließmuskels verschoben werden, so dass die Einstichstelle am vorderen Schließmuskel freigelegt wurde. Der Schließmuskel wurde mit Leitungswasser abgespült.

Punktion des vorderen Schließmuskels

Die Hämolymphe wurde durch Punktion des vorderen Schließmuskels aus Entenmuscheln gewonnen. Der Einstich erfolgte mit einer 0,6 mm Kanüle, die Einstichtiefe betrug ca. 3 mm. Um ein Durchstechen durch den Muskel zu verhindern, wurde die Kanüle durch Aufstecken einer 10 µl Pipettenspitze gesichert, die als Manschette einen geringen Widerstand beim Einstechen erzeugte. Die Einstichrichtung konnte parallel zur Körperachse gewählt werden, um zusätzlich Kontrolle über die Einstichtiefe zu behalten und ein Durchstechen des Muskels zu verhindern. Der Einstich erfolgte nur einmal, da durch den Kanülendurchmesser bedingt erhebliche Verletzungen am Schließmuskel durch mehrmaliges Einstechen auftreten konnten und die Gefahr der Ausbreitung von Infektionen in der Hämolymphe steigt. Nach dreiwöchigen Punktionsintervallen wurden wieder vergleichbare Hämozytendichten an einer Muschel erreicht (siehe Kap. 3.1.4.4). Nach dem Absaugen der Hämolymphe wurde die Kanüle von der Spritze entfernt und das Volumen der Hämolymphe luftblasenfrei in der Spritze bestimmt. Die gewonnene Hämolymphe wurde nur kurz (weniger als eine Minute) in 5 ml Polystyrolröhrchen bei RT aufbewahrt, bevor sie für den Testansatz eingesetzt werden konnte (siehe Kap. 2.4.1 und 2.4.3).



Abb. 26: Entnahme von Hämolymphe aus dem vorderen Schließmuskel

2.3.7 Plattierungsversuch von Hämolymphe

Um den mikrobiellen Besatz des Biofilms auf dem vorderen Schließmuskel und in der durch Punktion gewonnenen Hämolymphe vergleichen zu können, wurde ein Plattierungsversuch mit Muskelabschab-ungssuspension und Hämolymphe durchgeführt. Die Muskelabschabungssuspension wurde mit einem geeigneten Spatel durch Schaben und anschließendes Abstreichen des Biofilms in 100 μ l sterilem Anodontenpuffer gewonnen. Die Hämolymphe wurde wie unter Kap. 2.2.6 angegeben im Anschluss aus einer nicht beschabten Stelle des Muskels punktiert und ebenfalls in sterile Eppendorf-Reaktions-gefäße überführt. Der zuvor autoklavierte Agar wurde in einem Wasserbad bei 50 °C flüssig gehalten, und je 20 ml wurden pro Petrischale unter sterilen Bedingungen überführt. Nach Abkühlen des Agars auf Raumtemperatur wurden je 2 x 100 μ l einer Muskelabschab-ungssuspension und 2 x 100 μ l an Hämolymphe auf den Agarplatten mit einem Drygalskispatel kreisförmig verteilt und für 4 Tage im Brutschrank bei 30 °C in Dunkelheit inkubiert. Die Ergebnisse sind aus Kap. 3.1.4.2 zu entnehmen.

2.4 Methoden mit Muschelhämozyten

Für eine bessere Lesbarkeit des Kapitels wird der notwendige Geräte- und Chemikalienbedarf vorangestellt.

Geräte und Materialien

- Accuvetten (Fa. Beckmann Coulter GmbH)
- Autoklave, Tuttnauer 3870 ELV, (Fa. Systec)
- Binokular, Axiovert 25 (Fa. Zeiss)
- Brutschrank, HERAcell (Fa. Heraeus)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml (Fa. Eppendorf)
- FACS Calibur- Durchflusszytometer (Fa. Becton Dickinson)
- Fluoreszenz-Mikroskop und Zubehör (Fa. Zeiss, Typ: Imager Z1)
- Handschüttelgerät, Minishaker, MS 2 (Fa. IKA Labortechnik)
- Kühlschrank 4 °C, (Fa. Liebherr)
- Mikrotiterplatten, 96 Well (Fa. Greiner)
- Mikrotiterplattenlesegerät, (Fa. Tecan, Typ: Genios)
- Objektträger (Fa. Marienfeld) und Deckgläser 24 x 60 mm (Fa. Menzel-Glaser)
- Pipetten in diversen Größen und Spitzen
- Polystyrolröhrchen 12 x 75 mm 5 ml (Fa. Becton Dickinson, Bestell-Nr. 352054)
- Polyamid-Gaze, Monodur-PA 20 N (Maschenweite 20 μm, Fa. Verseidag Techfab 47608 Geldern- Walbeck)
- Schüttelinkubator besteht aus Schüttelmaschine R010 (Fa. Gerhard) in Brutschrank Rumed, Typ 3101 (Fa. Rubarth Apparate GmbH)
- Sterilwerkbank, Hera safe, (Fa Heraeus)
- Tiefkühlschrank -80 °C, Hera freeze, (Fa. Heraeus)

- Wasserbad, HS-B20, (Fa. IKA Labortechnik)
- Zellzählgerät, Coulter Counter Multisizer 3 (Fa. Beckmann Coulter GmbH)
- Zentrifuge 5415R (Fa. Eppendorf AG)

Chemikalien und Lösungen

- 17-Alpha-Ethinylestradiol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr.: R187992-1EA)
- Acenaphten (Fa. Supelco)
- Amphotericin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr.: A2411)
- BSA (Fa. Sigma-Aldrich A-2153)
- Carbamazipine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. C4024)
- CdCl₂ x H₂O (Fa. Merck, Nr. 1.02011.0100); M = 201,32 g/mol
- CH₃HgCl (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. 442534-5g-A); M = 251,08 g/mol
- CuCl₂ x 2H₂O (Fa. Riedel de Haen, Nr. 31286); M = 170,48 g/mol
- Dimethylsulfoxid (DMSO) minimum 99,5% GC (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Ethanol absolut (Fa. Merck)
- FITC markierte *E. coli* (Firma Invitrogen, Bestell-Nr. E-2861)
- Fluoreszenzmarkierte Latexpartikel, crimson fluorescent, 1µm diameter (Firma Molecular Probes, Bestell-Nr.: F-8816)
- Glutathion-Peroxidase von Rindererythrozyten (Fa. Sigma, Nr. G6137)
- HgCl₂ (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. 203777-50g); M =271,5 g/mol
- Katalase aus Rinderleber (Fa. Sigma, Nr. C3155)
- L-Glutathion reduziert (Fa. Sigma, Nr. G4251)
- Meerrettich-Peroxidase Typ II (Sigma, Bestell-Nr. P8250-50KU)
- NiCl₂ x 6H₂0 (Fa. Riedel de Haen, Nr. 13613); M = 237,7 g/mol
- PbCl₂ (Fa. Merck, Nr. 8.07383.0100); M = 278,1 g/mol
- PCB 138 (Fa. Promochem)
- PCB 153 (Fa. Promochem)
- Phenanthren (Fa. Supelco)
- Phenolrot (Fa. Merck, Bestell Nr. 1.07241.0005)
- Phorbol 12-myristat 13-acetat, TPA (Fa: Axxora GmbH, Bestell. Nr. ALX-445-004-MM05)
- Propidiumjodid (PJ), (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Bestell-Nr. P4170, 100 mg
- Sulfamethoxazol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr.: S7507)
- Superoxiddismutase von Rindererythrozyten (Fa. Sigma, Nr. S2515)
- Tetrazyklin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. 87128)
- <u>Anodonten-Puffer</u> (Chemikalien von Fa. Merck) (KH₂PO₄ 0,3135 g/l; Na₂HPO₄ 1,38 g/l; NaCl 0,5 g/l; KCl 0,746 g/l jeweils in Aquabidest.)
- Trypsin/ EDTA-Lösung 0,05% / 0,02% in PBS ohne Ca²⁺ u. Mg²⁺ (Fa. Biochrom, Bestell-Nr L2145).
- FKS, 10% (Fa. Biochrom Bestell-Nr.S 0113) in Anodonten-Puffer.
- FACS-Flow- Trägerflüssigkeit, FACS-Rinse, FACS-Clean (Fa. Becton Dickinson)

- Inkubationspuffer (Chemikalien von Fa. Merck)
 10mM Hepes, 5mM CaCl₂, 140 mM NaCl, pH einstellen auf 7,4
- Isoton II (Fa. Beckmann Coulter GmbH)
- PJ-Stammlösung: 50 µg PJ/ml Inkubationspuffer
- PJ-Markierungslösung: 1020 µl Inkubationspuffer + 20 µl PJ-Stammlösung
- Sytox-Green Nucleic Acid Stain (Fa. Invitrogen, Bestell-Nr. 7020)
- Trypanblaulösung, 0,1%ig (Trypanblau der Fa. Merck Bestell-Nr. 1.11732.0025)
- Wasserstoffperoxid 30% (Sigma, Bestell-Nr. H1009)

2.4.1 Zellzahlbestimmungen der Hämolymphe

2.4.1.1 Bestimmung der vitalen Hämozytenzahl in der Neubauer-Zählkammer

Direkt nach der Entnahme der Hämolymphe (siehe Kap. 2.3.6) erfolgte die Vitalitätsfärbung der Hämozyten mit Trypanblau. Zu 60 µl 0,1% Trypanblaulösung wurden 30 µl Hämolymphe in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und auf dem Handschüttelgerät bei 2500 U/min für 3 s durchmischt; die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für ca. 2 min. Nach der Färbung wurde der Ansatz erneut durchmischt und je 2 x 10 µl in die Neubauer-Zählkammer überführt. Die Auszählung der vitalen Zellen, d.h. Zellen die sich nicht durch Trypanblau anfärben lassen, erfolgte in den 8 Großquadraten der Neubauer-Zählkammer. Die Zellen in Aggregationen wurden bis zu einer Anzahl von 3 einzeln mitgezählt, da sie ebenfalls zur Phagozytose befähigt sind. Größere Aggregationen wurden näherungsweise als 3 Hämozyten bewertet, da die relative Aufnahmeoberfläche pro Hämozyt mit der Größe der Aggregate sinkt. Der Mittelwert der Auszählungen aus den Großquadraten wurde mit dem Verdünnungsfaktor (VF) von 3 der Hämolymphe durch die Trypanblaufärbung multipliziert. Der Umrechnungsfaktor, um eine Angabe als vitale Zellzahl pro ml zu erhalten, betrug 10000 und ergab sich aus dem Kammervolumen.

 V_{GQ} = Länge x Breite x Höhe = 3 mm x 3 mm x 0,1 mm = 0,9 mm³ Bezug auf 1 ml: 1000 mm³ / 0,9 mm³ = 1111,11 Für die Kammer (9 GQ): 1111,11 x 9 = 10000 ⇒ Mittelwert der Großquadratauszählung x 10000 x VF = vitale Zellzahl/ml

2.4.1.2 Bestimmung der Partikelzahl mit dem Coulter Counter

50 µl der Hämolymphe wurden zu 10 ml Isoton II in eine Accuvette gegeben. Die Messung wurde mit dem Coulter Counter, mit einer 100 µm Kapillaröffnung bei einem Messvolumen 1000 µl durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Multisizer 3-Software. Mit diesen Messungen konnten auch die Größenpopulationen der Hämozyten bestimmt werden (siehe Abb. 57 in Kap. 3.1.3). Eine Korrelation zwischen Neubauerzählung und Coulter Counter Messung von Hämolymphen wurde gefunden (siehe Abb. 46 in Kap. 3.1.2).

2.4.1.3 Bestimmung der Vitalitätsabnahme von Hämozytenprimärkulturen

Die Punktionsvolumina an Hämolymphen von 7 Entenmuscheln aus der Laborhälterung wurden jeweils zu gleichen Volumen in zwei 5 ml Polystyrolröhrchen aufgeteilt und für 6 Tage in Dunkelheit bei 25 °C aufbewahrt. Zu den Zeitpunkten 0, 3 und 6 d wurden die Hämolymphansätze für 5 s auf dem Handschüttelgerät bei 2500 U/min durchmischt und mit je 30 µl Hämolymphe die vitale Hämozytendichte wie unter Kapitel 2.4.1.1 im Doppelansatz bestimmt. Zu den Zeitpunkten 0 und 6 d fand eine Messung der Phagozytoseaktivität der Hämozyten statt. Die Ergebnisse sind Kapitel 3.1.4.3 zu entnehmen.

2.4.1.4 Bestimmung des Adhäsionsverhaltens von Hämozyten

Für diesen Versuch wurde Einzel- und Mischhämolymphe von Entenmuscheln aus der Laborhälterung gewonnen. Je 500 µl wurden im Doppelansatz in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße und 5 ml PS Röhrchen überführt. Zu den Messintervallen 0, 1, 2, 4, 6 und 24 h wurden die vitalen Hämozytendichten wie unter Kapitel 2.4.1.1 beschrieben doppelt bestimmt, nachdem die Ansätze für 3 s bei 2500 U/min auf dem Handschüttelgerät durchmischt wurden. Der Versuch fand überwiegend in Dunkelheit bei 25 °C statt. Die Ergebnisse sind Kapitel 3.1.5 zu entnehmen.

2.4.2 Mikroskopische Untersuchungen der Hämozyten

Größenmessungen der Hämozyten

Mehrere Entenmuscheln wurden punktiert. Nach der Punktion wurden mehrmals je 40 µl Hämolymphe pro Individuum auf einen Objektträger gebracht und durch das Auflegen eines Deckglases luftblasenfrei verteilt. Eine lichtmikroskopische Messung von je 100 Hämozyten pro Individuum erfolgte bei 400facher Vergrößerung mit einem Messokular. Die Hämozytengrößen von 4 Muscheln der Art *Anodonta anatina* wurden auf diese Weise ausgewertet (siehe Abb. 47 in Kap. 3.1.3), die gefundenen Größenklassen wurden auch durch Coulter Counter Messungen bestätigt (siehe Abb. 57 in Kap. 3.1.3).

Überprüfung der Phagozytoseleistung nach Phagozytoseansatz

Der Phagozytoseansatz mit Einzelhämolymphen aus der Laborhälterung bei 22 ± 3 °C wurde wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben durchgeführt. Nach 1, 2, 4, 6 und 20 h Phagozytoseaktivität wurden die Testansätze durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Zählungen der aufgenommenen Latexpartikel lagen in dem Bereich der durchflusszytometrisch bestimmten Phagozytoseleistung der aktiven Hämozyten. Beispiele für die teilweise recht hohen Aufnahmeleistungen sind auf den Abbildungen 53 bis 56 in Kap. 3.1.3 nach 20 h zu erkennen. Beide Methoden zeigten gute Übereinstimmungen.

Färbungen der Hämozyten

In der Hämatologie haben sich die Giemsa-Färbung, die May-Grünwald-Färbung und die kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Synonym: Pappenheim-Färbung oder panop-

tische Färbung) als Standardfärbungen etabliert. In der Pappenheim-Färbung entsteht, durch eine Farbsalzbildung basischer Farbstoffbestandteile mit sauren Zelleiweißanteilen, bzw. sauren Farbstoffkomponenten mit basisch reagierenden Zellsubstanzen, eine für viele Zelltypen charakteristische Färbung. Mit dieser Färbemethode ist es möglich, Blutzellen so anzufärben, dass alle geformten Blutbestandteile eines getrockneten Blutausstrichs unterscheidbar werden. Die Färbungen wurden nach Pappenheim im Krankenhaus Düren in der Klinik für Hämatologie/Internistische Onkologie im klinisch zytologischen Labor im April 2006 unter der Leitung von Dr. Marianne Engels durchgeführt. Native Hämolymphe mehrerer Anodonten wurde per Expresssendung in 5 ml Polystryrolröhrchen verschickt. Ein kleiner Teil dieser Färbungen ist in Kapitel 3.1.3, in den Abb. 48 bis 52 zu erkennen. Spätere Versuche diese Färbemethode anzuwenden führten zu schlechteren Färbeergebnissen, jedoch mit den gleichen qualitativen Aussagen. Artspezifische Unterschiede zwischen *Anodonta cygnea* und *Anodonta anatina* konnten nicht gefunden werden.

2.4.3 Phagozytoseansatz mit Muschelhämozyten

Die Methode der Messung der Phagozytoseaktivität konnte verbessert werden, indem statt gelb-grün fluoreszierende Latexpartikel, purpurfarbene (crimson) fluoreszierende Latexpartikel eingesetzt wurden. Damit konnte eine simultane Bestimmung von Phagozytoseaktivität im Fluoreszenzkanal 4 und der Vitalität durch Sytox-Green in Fluoreszenzkanal 1 erfolgen.

Herstellung der Bead-Suspension

Ein konstantes Latexpartikel (Bead) - Zellenverhältnis von 100 zu 1 wurde eingestellt, um gleiche Aufnahmebedingungen für die Testansätze auch im Vergleich zu Säugerimmunzellen herzustellen. Das Einstellen der Bead-Suspension erfolgte mit Anodontenpuffer. Die Messung der Beadsuspensionsdichte wurde mit dem Coulter Counter durchgeführt, indem die Beadsuspension zuvor 1 zu 100 mit Anodontenpuffer verdünnt wurde. Die Messungen erfolgten mit Isoton II und einer 20 µm Kapillaröffnung, einem Messvolumen von 50 µl und einem Probenvolumen von 100 µl, welches zuvor in 10 ml Isoton II gegeben wurde.

Zusammensetzung des Phagozytoseansatzes

Die Hämozytenzahl wurde durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt, da nur vitale Zellen potenziell zur Phagozytose befähigt sind (siehe Kap. 2.4.1.1). Aus den Vortestungen, deren Ergebnisse in Kapitel 3.1.6.1 bis 3.1.6.3, dargestellt wurden, ergab sich, dass der Testansatz optimal mit 50000 vitalen Hämozyten funktioniert. Ein Parallelansatz mit 3 bis 4 Replikaten kann in der Regel aus einer Muschel generiert werden (siehe Kap. 3.1.2). Durch das ausgeprägte Adhäsions-und Aggregationsverhalten der Hämozyten wurde die Hämozytenzahl direkt vor der Inkubation mit den Beads bestimmt. Es wurde ein Hämozyten/Bead-Verhältnis von 1 zu 100 in 5ml Polystyrol-Röhrchen auf ein Gesamtvolumen von 500 µl im Testansatz eingestellt, damit die Beadaufnahmewahrscheinlichkeit im Testansatz sollte in Polystyrolröhrchen erfolgen, da diese die Adhäsionsfähigkeit der Hämozyten über längere Versuchszeiten herabsetzen (siehe Kapitel 3.1.5) und zu ausreichend hohen Ereigniszahlen im Durchflusszytometer führen. Vorlage des errechneten Volumens an Anodontenpuffer

+ Volumen der Hämolymphe, das 5 x 10⁴ Hämozyten enthält.

+ Volumen der 1 zu 100 verdünnten Beadsuspension, die 5 x 10⁶ Beads enthält.

Summe: 500µl Testansatz

Nach jeder Zugabe sollte der Testansatz für 5 s bei 2500 U/min auf dem Handschüttelgerät durchmischt werden.

<u>Beispielrechnung</u>: Die vitale Hämozytendichte beträgt 500000 /ml, d.h. man benötigt 100 µl Hämolymphe für 50000 Hämozyten. Die Beaddichte einer 1 zu 100 Verdünnung = 5 x 10^8 / ml, d.h. man benötigt 10 µl der verdünnten Beadsuspension. Das Volumen an Anodontenpuffer errechnet sich aus 500 µl – 100µl Hämolymphe – 10 µl Beadsuspension = 390 µl.

Hämolymphen mit einer Hämozytenzahl geringer als 110000 Hämozyten/ml können mit diesem Testansatz nicht berücksichtigt werden, da das Eigenvolumen der Hämolymphe keine weiteren Anteile im Testansatz zulässt. Eine direkte Aufkonzentrierung der Hämozyten durch Zentrifugation erweist sich als problematisch, da die Adhäsionfähigkeit einem Zeitverlauf folgt. Vorherige Behandlungen der Hämozyten können zu Veränderungen der Phagozytoseleistung führen.

Versuchsbedingungen

Die Inkubationszeit betrug 20 h. Mikroskopische Beobachtungen zeigten, dass ausreichende Phagozytoseleistungen der Hämozyten nach 20 h Inkubation erreicht werden (siehe Abb. 53-56 in Kap. 3.1.3). Das Adhäsionsvermögen der Hämozyten ist nach dieser Zeit ausreichend verringert, um durchflusszytometrisch mit hohen Ereigniszahlen messen zu können (siehe Kap. 3.1.5). Auf die Kinetik von Adhäsion und Phagozytoseaktivität wird in Kapitel 3.1.6.4 eingegangen. Hämozyten von Entenmuscheln aus unterschiedlichen Hälterungsbedingungen zeigten bei einer Versuchstemperatur von 25 °C die beste Phagozytoseaktivität (siehe Abb. 86 in Kap. 3.1.6.7). Diese Temperatur wurde einheitlich als Versuchstemperatur gewählt. Um eine gleichmäßige Aufnahmewahrscheinlichkeit der Beads für die Hämozyten zu gewährleisten und eine Sedimentation von Latexpartikel zu verhindern, wurde eine Schüttelbedingung von 150 U/min bei einer kreisförmigen Auslenkung von ca. 1cm Radius gewählt. Die Messungen wurden, sofern es die Hämolymphgewinnung zuließ, mit mindestens drei Replikaten pro Individuum durchgeführt.

2.4.4 In vitro-Hemmversuche mit Muschelhämozyten

Um genügend Hämozyten für Hemmversuche zur Verfügung zu haben, kann Mischhämolymphe aus den Einzelhämolymphen von Individuen aus der Laborhälterung hergestellt werden. Die Hämozytenzahl ist erneut zu bestimmen und liegt in der Regel niedriger als der Mittelwert der Hämozytenzahlen der Einzelhämolymphen, da es zu verstärkten Adhäsionsund Aggregationsverhalten in der Folge einer Interimmunreaktion der Mischhämolymphe kommt. Zusätzlich zum Testansatzvolumen können 125 µl Probe oder Referenzsubstanzlösung gegeben werden. Die Probe wurde dadurch 1 zu 5 mit dem Testansatz verdünnt (125 µl in 625 µl), die Negativkontrollen wurden mit 125 µl Aqua bidest. aufgefüllt. Durch die Verdünnung des Testansatzes mit Aqua bidest. entstand keine signifikante Abnahme der Phagozytoseeigenschaften im Testansatz. Bei den Testungen mit Pharmazeutika, PAK und PCB wurde Ethanol als Löslichkeitsvermittler eingesetzt. Die Probenkonzentration des Ethanols betrug jeweils 1% und hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Negativkontrollen. Da das Niveau der Phagozytoseaktivität der Negativkontrollen durch unterschiedliche Zusammensetzungen der Mischhämolymphen variieren konnte, hat es sich bewährt, die Hemmwirkungen relativ zu den Negativkontrollen anzugeben. Sigmoidale Konzentrations-Wirkungsbeziehungen konnten durch ein 4-parametrisches logistisches Modell in Sigma-Plot 9.0 mit 100 Iterationsschritten beschrieben werden.

Die allgemeine Gleichung dieses Modells lautet:

$$f(\mathbf{x}) = \frac{\mathbf{A}}{\mathbf{1} + \left(\frac{\mathbf{x}}{\mathbf{C}}\right)^{\mathbf{B}}} + \mathbf{D}$$

Abb. 27: 4-parametrisches logistisches Modell zur Berechnung von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen.

A= Differenz aus maximalen und minimalen Messwert; B= Steigung am Testmittelpunkt; C= Konzentration am Testmittelpunkt (EC₅₀); D= minimaler Messwert; x= Konzentration der Referenzsubstanz.

Direkt aus der Funktionsgleichung kann der EC_{50} -Wert ermittelt werden. Sichere Nachweisgrenzen stellen die EC_{20} -Werte dar, da die prozentualen Variationskoeffizienten im Dreifachansatz um 8% liegen und bei einer Normalverteilung der Daten über 95% der Daten innerhalb von 2 Standardabweichungen um den Mittelwert streuen (Messunsicherheit nach DIN 1319). Durch zytotoxische Wirkungen in bestimmten Konzentartionsbereichen der getesteten Substanzen, war es nicht immer möglich 10000 Ereignisse zu erfassen und abzuspeichern. Die Ergebnisse der Hemmversuche sind den Kapiteln 3.2.2 bis 3.2.4 zu entnehmen.

2.4.5 Vorbereitung der Testansätze für die durchflusszytometrische Messung

Um Anlagerungen von Latexpartikeln an Hämozyten nicht als Aufnahmen von Latexpartikeln zu messen und auch eine getrennte Bestimmung von Hämozyten aus Aggregaten zu gewährleisten, mussten die Aggregationen vereinzelt werden. Vereinzelungsvarianten durch Ultraschallbehandlungen sind gescheitert, doch wurden gute Ergebnisse mit einer Testansatzvorbehandlung mit Trypsin EDTA-Lösung erzielt (siehe Kap. 3.1.6.6). Die Behandlung der Testansätze erfolgte in 5 ml Polystyrolröhrchen. Zum Testansatz wurden für 2 min 100 µl Trypsin EDTA-Lösung gegeben und durchmischt, die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Das Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Zugabe von 300 µl 10%ige FBS-Lösung. Anschließend wurde der Ansatz für 5 s auf dem Handschüttelgerät bei 2500 U/min durchmischt.

Testansatzvorbehandlung

500 µl Testansatz (Hämolymphe, Latexpartikel, Anodonten-Puffer)

- + 100 μl Trypsin/ EDTA für 2 min bei RT und jeweils 2-3 x für 5 s auf dem Handschüt telgerät bei 2500 U/min durchmischen
- + 300 μl 10% FBS in Anodonten-Puffer (5s bei 2500 U/min durchmischen, 5 min Inku bation bei RT)

Nach Beendigung der Trypsinierung erfolgte eine Weiterbehandlung der Testansätze auf Eis, um weitere Anlagerungen und Adhäsionen zu minimieren. Die Testansätze wurden bei 350 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren und anschließendes vorsichtiges Absaugen mit der Pipette verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl Anodonten-Puffer durch 5maliges Einsaugen und Ausstoßen mit einer Pipette resuspendiert. Anschließend wurde der Testansatz für 5 s auf dem Handschüttelgerät bei 2500 U/min durchmischt und war für eine durchflusszytometrische Messung der Phagozytoseaktivität vorbereitet.

Vitalitätsfärbung der Muschelhämozyten mit Sytox-Green

Analog zur Färbemethode mit Propidiumjodid (siehe Kap. 2.2.4) kann eine Färbung der Hämozyten mit Sytox-Green, einem nicht membrangängigen DNA-Fluoreszenzfarbstoff, erfolgen. Die Messung von nekrotischen Zellen erfolgt hingegen im Fluoreszenzkanal 1. Eine 100 μ M Sytox-Green Lösung in 100% DMSO wurde kurz vor Gebrauch mit Anodontenpuffer auf eine 1 μ M Sytox-Green Lösung in 1 % DMSO verdünnt. Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet des Testansatzes kann mit 300 μ l der 1 μ M Sytox-Green Färbelösung in 1% DMSO durch 5maliges Einsaugen und Ausstoßen mit einer Pipette resuspendiert werden. Anschließend wurde der Testansatz für 5 s auf dem Handschüttelgerät bei 2500 U/min durchmischt. Die Färbung sollte für mindestens 15 min bei Raumtemperatur erfolgen, eine Verschiebung der nekrotischen Anteile findet innerhalb einer Standzeit von 3 Stunden nicht statt. Die Stammlösung des Sytox-Green wurden dunkel und kühl bei 4 °C aufbewahrt und erst vor dem Gebrauch aufgetaut. Beide Vitalitätsfärbungen wurden an Muschelhämozyten nach der Einwirkung von NiCl₂ gegenüber gestellt, die Ergebnisse sind dem Kapitel 3.1.7 zu entnehmen.

Optionale Testansatzvorbehandlung bei kürzeren Messintervallen

Eine zusätzliche Aufreinigung der Hämolymphe kann durch Filtration durch eine Polyamid-Gaze erfolgen (Maschenweite 20 µm). Der Testansatz kann durch die Gaze mittels einer Spritze gedrückt werden und in 5 ml Polystyrolröhrchen aufgefangen werden. Es konnten so größere Trümmer und Aggregationen von Zellen, die eine durchflusszytometrische Messung gefährden, minimiert werden. Diese Behandlung wurde bei Messintervallen unter 6 Stunden eingesetzt, da hier der Anteil unspezifischer Anlagerungen erheblich größer ist.

Eine Abtrennung der Latexpartikel und kleinerer Trümmeranteile konnte auch durch differentielle Zentrifugation bei 250 x g mit 3%igem BSA erfolgen.

2.4.6 Durchflusszytometrische Messung der Testansätze

Geräteeinstellungen

Der maximale Probeneinzug wurde auf ca. 80 µl/min justiert, die Messung dauerte 210 s. Eine valide Messung fand statt, wenn von den 50000 eingesetzten vitalen Hämozyten mindestens 10000 im Zellgrößenbereich, unter chemisch unbelasteten Bedingungen, nach dem Phagozytoseansatz gemessen werden konnten. Für die Messungen mit der crimson fluoreszierenden Partikelquelle, musste eine Zuschaltung des roten Anregungslasers bei 635 nm erfolgen. Treshold und Compensation wurden auf 0 gesetzt.

Tab. 8: Grundeinstellungen für die Messung von Phagozytoseaktivität und Vitalität von Muschelhämozyten

Detektor	Voltage	Amp Gain	Mode (Ver- stärkung)
FSC	E-00	1,50	Lin
SSC	310	1,00	Lin
FL 1	300		Log
FL 2	300		Log
FL 3	450		Log
FL 4	300		Log

Eine Auswertungsmaske mit Dotplot- und Histogrammdarstellungen wurde mittels Cell Quest Pro erstellt.

2.4.7 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) von Muschelhämozyten mit Phenolrot

2.4.7.1 Testprinzip zur Messung der ROS Produktion von Immunzellen

Für die Messung der ROS-Produktion wurde ein mikrotiterplattenbasiertes Verfahren gewählt, welches einen noch effizienteren Probendurchsatz gewährleistet. Die Immunzellen wurden in die Kavitäten überführt, und die extrazelluläre ROS-Produktion wurde durch die Oxidation von Phenolrot, einem Farbindikator angezeigt.



Abb. 28: Strukturformel des Phenolrots

Reaktive Sauerstoffspezies können durch die unspezifische Meerrettichperoxidase eine schnelle Oxidation des Phenolrots an den Hydroxylgruppen bewirken (Dehydrogenierungsreaktion), was zu einer Extinktionserhöhung des Phenolrots führt (siehe Abb. 29). Die Extinktion des oxidierten Phenolrots ist über das Lambert-Beersche Gesetz proportional zu dessen Konzentration [64]. Die Extinktionszunahme kann mit Kalibrationslösungen einer bestimmten Stoffmenge an Radikaläquivalenten zugeordnet werden und erlaubt eine Umrechnung in ROS-Produktionsraten pro Zeiteinheit.

Reaktionsbeispiel: Phenolrot + $nH_2O_2 \rightarrow oxidiertes$ Phenolrot + mH_2O



Abb. 29: Absorptionsspektren und Extinktionszunahmen von Phenolrot durch unterschiedliche Wasserstoffperoxidkonzentrationen im Testansatz.

Primär wird durch die Phenolrotmethode die Generierung von Wasserstoffperoxid nachgewiesen, doch können Superoxidanionen entweder spontan oder durch die Wirkung der Superoxiddismutase (siehe Kap. 1.2.4.2) zu Wasserstoffperoxid umgesetzt werden [118]. Damit ist die Phenolrotmethode in der Lage auch einen Teil der Superoxidanionen zubestimmen. Dieses Verfahren wurde trotz seiner pH-Empfindlichkeit gewählt, da es schnell, kostengünstig und vor allem kontinuierlich reaktive Sauerstoffspezies anzeigen kann. Von einem toxischen Einfluss des Phenolrots in den verwendeten Konzentrationsbereichen ist nicht auszugehen da Phenolrot seit Jahrzehnten einen Einsatz in vielen Zellkultivierungen findet. Die Nachweisgrenze für H_2O_2 im Phenolrotansatz liegt bei 1 nmol/ml [64].

Andere gängige Radikalnachweismethoden, z.B. mit Luminol erlauben nur im basischen Milieu luminometrische Messungen, d.h. die ROS-Produktions-Kinetik hätte durch bestimmte Intervallmessungen rekonstruiert werden müssen, was einen höheren Immunzellenbedarf zur Folge hätte.

Methodenanpassung auf Anodontenhämolymphe

In Anlehnung an die Phenolrot-Methode von R. K. Pipe von 1990 zur Messung der ROS-Produktion von Miesmuschelhämozyten [65] wurde eine Methode getestet, die eine Produktion von Sauerstoffradikalen bei Anodontenhämozyten bestimmen kann.

Herstellung der Phenolrot-Stocklösung

Die Testkonzentration für Phenolrot von Pipe beträgt 0,28 mmol/l. Der Testansatz mit Anodontenhämolymphe setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Tab. 9: Zusammensetzung des Testansatzes der ROS-Messung von Anodontenhämozyten

Testansatzkomponenten			
Hämolymphe + Puffer	= 200 µl		
Meerrettichperoxidase	= 20 µl		
Phenolrotlösung	= 80 µl		

Es ergibt sich ein Testansatzvolumen von mindestens 300 µl. Die Stammkonzentration der Phenolrotlösung ist folglich 300µl / 80µl fach höher zu wählen als die Testkonzentration aus [65].

0,28 mM x 300 µl / 80µl = 1,05 mmol/l

M (Phenolrot) = 354,38 g/mol

n x M = m = 1,05 mmol/ l x 354,38 g/mol = 372 mg/l

Die Stocklösung wird 10fach konzentrierter in Anodontenpuffer angesetzt und direkt vor dem Gebrauch 1 zu 10 in Anodontenpuffer verdünnt.

Herstellung der Peroxidase-Stocklösung

Eine Peroxidase Lösung (1 mg Peroxidase pro ml Anodontenpuffer) wurde à 0,5 ml aliquotiert und konnte bis zur Verwendung bei -20 °C für mehrere Wochen eingefroren werden. Bei Bedarf wurde ein Aliquot aufgetaut, und es erfolgte eine 1/16 Verdünnung in Anodonten Puffer als Gebrauchslösung.

2.4.7.2 Bestimmung des Arbeitsbereiches der Phenolrotmethode

Um den Arbeitsbereich der Phenolrotmethode zu bestimmen wurden Wasserstoffperoxidkalibrationslösungen hergestellt und im Mikrotiterplattenansatz gemessen. Eine 30% ige H_2O_2 -Lösung wurde mit Anodontenpuffer auf die Verdünnungstufen 1 zu 1, 1 zu 10, 1 zu 15 und 1 zu 25 verdünnt. 100µl der H_2O_2 -Verdünnungen wurden in 1 zu 2 Verdünnungsreihen im Doppelansatz auf der Mikrotiterplatte mit Anodontenpuffer verdünnt.

Testansatzkomponenten			
H ₂ 0 ₂ -Lösung + Puffer	= 200 µl		
Meerrettichperoxidase	= 20 µl		
Phenolrotlösung	= 80 µl		

Tab. 10: Zusammensetzung der Testansätze der Kalibrationsmessungen mit H₂O₂

Nach der Zugabe der Phenolrotlösung werden die Kavitäten 3 x mit einer 200 µl Pipette durchmischt und bei 25 °C inkubiert. Die Messung erfolgten nach einer Standzeit von 100 min (um eine vollständige Oxidation des Phenolrots zu gewährleisten) bei 595 nm photometrisch.

M(H₂0₂) = 34,01 g/mol

n = m/M= 30g / 34,01 g/mol = 0,8821 mol

0,8821 mol entsprechen 100 ml

0,8821 mmol entsprechen 100 µl.

Die daraus resultierende Testansatzkonzentration an H_2O_2 konnte errechnet werden, und es ergab sich ein linearer Arbeitsbereich für die Phenolrotmethode (siehe Abb. 88 in Kap. 3.1.8.1). Aus diesem Zusammenhang konnten die ROS-Produktionen der Andontenhämozyten in H_2O_2 -Radikaläquivalente umgerechnet werden. Durch die Säurewirkung des H_2O_2 ist der lineare Zusammenhang zwischen der H_2O_2 -Konzentration und der Extinktion des Phenolrots nur in bestimmten Konzentrationsbereichen linear.

2.4.7.3 Stimuliversuche mit Mischhämolymphe

Herstellung der Stimuli-Lösungen

- <u>FITC-E. coli-Stimulus-Lösung</u>
 1 mg/ml FITC-markierte *E.coli* wurden in Anodontenpuffer gelöst und bei -20 °C in der Dunkelheit aufbewahrt. Bei Bedarf wurde die Lösung aufgetaut.
- <u>Latexpartikel-Stimulus-Lösung</u>
 Die Latexpartikellösung wurde auf 5 x 10⁶ Partikel pro 30µl mit Anodontenpuffer verdünnt.
- <u>Ethanol-Stimulus</u>
 Verschiedene Ethanolkonzentrationen wurden in Testkonzentrationen zwischen 0,001 und 10% getestet.

Mikrotiterplattentestansatz

Die Hämolymphgewinnung erfolgte bei den Entenmuscheln aus dem vorderen Schließmuskel (siehe Kap. 2.3.6). Ein Hämolyphmphvolumen, welches 50000 vitalen Hämozyten entsprach, wurde in die Kavitäten der Mikrotiterplatte überführt und auf 200 µl mit Anodonten-Puffer aufgefüllt. Die Hämozyten wurden für 2h bei 25 °C in der Dunkelheit in den Kavitäten belassen, bevor ein Stimulus in die Kavitäten zugegeben wurde.

Testansatzkomponenten			
Hämolymphe + Puffer	= 200 µl		
Meerrettichperoxidase	= 20 µl		
Phenolrotlösung	= 80 µl		
Stimulus	= 30 µl		

Tab. 11: Zusammensetzung der Testansätze der Stimuliversuche

Nach der Zugabe des Stimulus wurden die Kavitäten 3 x mit einer 200 µl Pipette durchmischt und bei 25 °C inkubiert. Die Messung erfolgte dann nach Zugabe der Phenolrotlösung und nochmaligem Durchmischen bei 595 nm photometrisch für 4h in 15-minütigen Messintervallen. Die Ergebnisse sind dem Kapitel 3.1.8.3 zu entnehmen.

2.4.7.4 Schwermetallwirkungen auf die ROS-Produktion von Muschelhämozyten

Eine Ausgangskonzentration der Schwermetalle von 1 mol/l wurde mit bidest. Wasser hergestellt und anschließend in einer Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor von 1 zu 10 bis zu einer Konzentration von 10^{-8} mol/l verdünnt. Im Mikrotiterplattenansatz kamen 7 unterschiedliche Verdünnungsstufen um den EC₅₀-Wert der Phagozytosehemmung (siehe Kap. 3.2.2) zum Einsatz.

Mikrotiterplattentestansatz

Die Hämolymphgewinnung erfolgte bei den Entenmuscheln aus dem vorderen Schließmuskel (siehe Kap. 2.3.6). Es wurde Mischhämolymphe mit einem Volumen von ca. 15 ml generiert und die vitale Hämozytenzahl mit der Trypanblau Neubauerzählung bestimmt. Ein Hämolymphvolumen, welches 50000 Hämozyten entspricht, wurde in die Kavitäten der Mikrotiterplatte überführt und auf 200 µl mit Anodonten-Puffer aufgefüllt.

Tab.	12: Zusammensetzung	der	Testansätze	der	Schwermetallversuche
I UNI		aor	10010100120	aor	Convolution

Testansatz	Negativkontrolle	Blindprobe
Hämolymphe + Puffer	Hämolymphe + Puffer	Puffer
= 200 µl	= 200 µl	= 200 I
Meerrettichperoxidase	Meerrettichperoxidase	Meerrettichperoxidase
= 20 µl	= 20 µl	= 20 µl
Schwermetalllösung	Aqua bidest.	Schwermetalllösung
= 30 µl	= 30 µl	= 30 µl
Phenolrotlösung	Phenolrotlösung	Phenolrotlösung
= 80 µl	= 80 µl	= 80 µl

Jede Konzentration der Schwermetalle wurde im Doppelansatz getestet. Nach der Zugabe der Schwermetalllösung wurden die Kavitäten 3 x mit einer 200 µl Pipette durchmischt und

bei 25 °C inkubiert. Die Messung erfolgte nach Zugabe der Phenolrotlösung und nochmaligem Durchmischen bei 595 nm photometrisch. Es wurden Intervallmessungen im Abstand von 30 min über eine Versuchszeit von 9 h und 30 min durchgeführt. Die Ergebnisse sind dem Kapitel 3.2.5 zu entnehmen.



Abb. 30: Mikrotiterplattentestansatz der Phenolrotmethode *in vitro* unter Schwermetalleinfluss.

Bei den beiden höchsten Schwermetallkonzentrationen von CH₃HgCl, HgCl₂ und der höchsten CdCl₂–Konzentration kam es zu Farbumschlägen des Phenolrots von rot nach gelb, was durch entsprechende Blindproben auf einer weiteren Mikrotiterplatte berücksichtigt werden musste. Ein Kontrollversuch zur Peroxidase-Hemmung mit den getesteten Schwermetallkonzentrationen (nach EC 1.11.1.7) ergab, dass genügend Restaktivität bei allen Schwermetallkonzentrationen zur Verfügung stand, um Oxidationsprozesse zu katalysieren.

2.4.7.5 Allgemeine Methode der Auswertung

Mit der Phenolrotmethode ist eine kontinuierlicher Nachweis der ROS-Produktion und eine Umrechnung in Radikaläquivalente pro Zeiteinheit möglich. Die OD-Messwerte der Blindwerte wurden von den OD-Messwerten der Testansätze subtrahiert. Aus den OD-Differenzen wurden die Differenzen zu den Folgewerten berechnet und in µmol H₂O₂-Radikaläquivalente umgerechnet.

Beispiel:

 $OD_{Testansatz} - OD_{Blindwert} = 0,400 - 0,300 = 0,100 = OD_{Differenzwert}$

 $OD_{Differenzwert 60 min} - OD_{Differenzwert 30 min} = 0,150 - 0,100 = 0,050 = OD_{Folgedifferenz}$

Aus den Folgedifferenzwerten konnte aus der linearen Beziehung zwischen H_2O_2 -Konzentration und der OD_{595} (siehe Abb. 86 in Kap. 3.1.8.1) die stündliche Radikalproduktion in H_2O_2 -Radikaläquivalenten errechnet werden.

Stoffmenge H_2O_2 / h = OD $_{\rm Folgedifferenz}$ / 0,01146 x 2 =0,050 / 0,01146 x 2 $\mu mol/h$ = 8,726 $\mu mol/h$

Die Radikalproduktion konnte für einen bestimmten Versuchszeitraum, z.B. 8 h summiert werden und in Relation zu den Negativkontrollen gesetzt werden.

Neben dem Arbeitsbereich der Methode für H_2O_2 -Radikaläquivalente (siehe Kap. 3.1.8.1), wurden die Kinetiken der Radikalproduktionen von Einzel-und Mischhämolymphe (Kap. 3.1.8.2 und 3.1.8.4) aufgenommen. Dabei konnte auch eine direkte Korrelation von Hämozytenzahl im Testansatz zur gemessenen ROS-Produktion in Zeitabhängkeit bis zu 16 h gefunden werden (siehe Kap. 3.1.8.2).

Aus Vorversuchen mit Wasserstoffperoxid und mit Anodontenhämozyten konnte abgeleitet werden, dass auf einen Dextrose-Zusatz sowie die Verwendung der Stopplösung, wie sie in [65] beschrieben wird, im Ansatz verzichtet werden kann (siehe Kap. 3.4.2 und 3.4.3). Eine Erweiterung des Messbereichs für H_2O_2 kann zwar erfolgen [64], indem vor der Messung der pH-Wert durch Zugabe von Natronlauge angehoben wird. Was aber bei den ROS-Produktionen von bis zu 50000 Hämozyten im Testansatz für bis zu 16 h nicht notwendig ist (siehe Abb. 88 in Kap. 3.18.2) und den Versuchsaufwand und den Hämozytenbedarf erhöhen würde. Die ROS-Produktion an H_2O_2 von 50000 Hämozyten im Testansatz ist zu gering und wird sofort von der Merrettichperoxidase zur Oxidation des Phenolrots umgesetzt, damit entstehen keine pH-Schwankungen, wie sie sich *in vitro* bei den höchsten Schwermetallkon-zentrationen zeigten. Eine kontinuierliche Bestimmung der ROS-Produktion ist gegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zur Entwicklung und Validierung eines *In vitro*-Testverfahrens

3.1.1 Ergebnisse mit den Säugerimmunzellen

3.1.1.1 Wachstum und Vitalität der HL60-Zellen

Zur Etablierung eines *In vitro*-Testsystems zur Messung von Phagozytoseaktivitäten wurde zunächst eine Methode an einer Zellkultur entwickelt. Mit dieser Methode sollte anschließend eine Anpassung an Muschelhämozyten durchgeführt werden, die erfahrungsgemäß stärkeren methodischen Einflüssen unterliegen. Es wurde die humane Leukozytenzelllinie HL 60 aufgrund ihrer guten Wachstumseigenschaften in Suspensionskultur für die Etablierung eines *In vitro*-Testystems gewählt.



Abb. 31: Wachstumsverlauf einer HL 60–Suspensionskultur über 14 d. Die Zellzahlbestimmungen erfolgten mit dem Multisizer-3 Coulter Counter.

Es errechnet sich eine Verdopplungszeit von ca. 19,5 Stunden in der logarithmischen Wachstumsphase. Für Phagozytosemessungen wurden nur HL 60-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Mit zunehmenden Alter der Zellkultur ergaben sich durchflusszytometrisch nach Propidiumjodidfärbung Verschiebungen im nekrotischen Anteil (siehe Abb. 32 und 33).



Abb. 32 und 33: Vorwärtsstreulicht (FSC) und Fluoreszenzintensität (FL3-H) von HL 60-Zellen nach Propidiumjodid-Färbung aus der logarithmischen Wachstums- (links) und aus der Stagnationsphase (rechts). Der nekrotische Zellanteil verschiebt sich von 7% aus der log-Phase auf 18% in der Stagnationsphase. A = Trümmer mit DNA-Anteil, B = nekrotische Zellen, C = Trümmer, D = intakte Zellen. Die Darstellung erfolgte mit Cell Quest Pro.

3.1.1.2 Phagozytoseaktivität von HL60-Zellen

Den HL 60-Zellen wurde für die Bestimmung der Phagozytoseaktivität eine Partikelquelle von gleichbleibender Qualität angeboten. Fluoreszenzmarkierte Latexbeads mit einem mittlerem Durchmesser von nur 1 µm wurden gewählt, da diese auch für Zellen geringer Größe gut zu phagozytieren sind und somit auch Mehrfachaufnahmen für eine weitere Differenzierung der Phagozytoseleistung möglich sind. Zellen, die fluoreszenzmarkierte Latexpartikel aufgenommen haben, erzeugen im Durchflusszytometer proportional zur Aufnahmeleistung ein Fluoreszenzsignal (siehe Abb. 8 und Abb. 9 in Kap. 2.1.1).



Abb. 34: Beispiel einer fluoreszenzmarkierten Latexpartikelaufnahme einer phagozytoseaktiven HL 60-Zelle, nach 4h Phagozytoseprozess. Der mittlere Zelldurchmesser der HL 60-Zellen beträgt 15 μm. Der grüne Pfeil weist auf einen fluoreszenzmarkierten Latexpartikel.

Messung und Berechnung des Phagozytoseanteils

Durch die Phagozytoseaktivität der Zellen kommt es zu einer Verschiebung des phagozytoseaktiven Anteils der Zellen an der Gesamtzellzahl mit zunehmender Versuchszeit.



Abb. 35, 36 und 37: Zunahme des Anteils an fluoreszenten Zellen durch Phagozytoseaktivität in Abhängikeit von der Versuchszeit. Die Abbildungen zeigen Dotplotdarstellungen von HL 60-Zellen mit Fluoreszenzintensitäten zu den Zeitpunkten 90 min,180 min, 360 min von links nach rechts. Die Darstellung erfolgte mit Cell Quest Pro, x-Achse Vorwärtsstreulicht (FSC) als relatives Maß für die Zellgröße, die y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität (FL1-H).

Die Berechnung des Phagozytoseanteils erfolgt nach:

Phagozytoseanteil in % =
$$\frac{\text{Anzahl der fluoreszenten Ereignisse in Zellgröße (PE)}}{\text{Gesamtereigniszahl in Zellgröße (GE)}} \times 100\%$$

Messung und Berechnung der Phagozytoseleistung

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Fluoreszenzintensitäten der Zellen genauer aufzulösen und damit die Aufnahmeleistung an Partikeln zu errechnen.



Abb. 38: Fluoreszenzintensitäten von HL 60-Zellen nach 240-minütigem Phagozytoseprozess mit fluoreszierenden Latexpartikeln. x-Achse Fluoreszenzintensität, y-Achse kumulative Häufigkeit der gemessenen Ereignisse. Die Intervallgrenzen ermöglichen die Berechnung der mitttleren Fluoreszenzintensität der untergeordneten Aufnahmeklassen.

Jeder Peak in der Grafik wird von Zellen verursacht, die eine unterschiedliche Anzahl an fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln aufgenommen hat. Da die Fluoreszenz der Zellen proportional zur Anzahl der aufgenommenen Latexpartikel ist, kann aus der mittleren Fluoreszenzintensität die Phagozytoseleistung errechnet werden.

Die Berechnung der Phagozytoseleistungen erfolgt nach:

Phagozytoseleistung (PE) in Beads/Zelle <u>Mittelwert der Fluoreszenzintensität aller fluoreszenten Ereignisse in Zellgröße</u> Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Ereignisse mit einem Latexpartikel

Die errechnete Phagozytoseleistung bezieht sich dabei auf fluoreszente, phagozytoseaktive Ereignisse (PE), bzw. Zellen. Um Aussagen über die mittlere Aufnahmeleistung aller Immunzellen oder Gesamtereignisse (GE) treffen zu können, muss zusätzlich der Phagozytoseanteil in die Berechnung einbezogen werden.

Phagozytoseleistung (GE) Phagozytoszeleitung (PE) in Beads/Zelle x Phagozytosenteil in % in Beads/Zelle 100 %

Die Phagozytosleistung bezogen auf die Gesamtereigniszahl (GE) zeigt die Phagozytoseaktivität der gesamten Zellpopulationen an. Hingegen betrachtet die Phagozytoseleistung, bezogen auf die Positivereignisse (PE), nur den Ausschnitt der phagozytoseaktiven Zellen. Auch integriert die Phagozytoseleistung (GE) als Messpara-meter bereits Veränderungen vom Phagozytoseanteil und der Phagozytoseleistung (PE).

Deshalb wurde die Phagozytoseleistung (GE) als bevorzugte Messgröße der Phagozytoseaktivität verwendet. Bei den Abwasserversuchen kam die Phagozytoseleistung (PE) als separater Messparameter zum Einsatz, da eine Bestimmung immunmodulierender Potenziale nicht unbedingt die gleichzeitige Veränderung von Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung voraussetzt (siehe Abb. 154 in Kap. 4.3.2.2). Die Veränderung der Fluoreszenzintensität der Zellen und damit der Phagozytoseleistung folgt wie der Phagozytosenanteil einer Kinetik. Beide Messparameter zeigten im untersuchten Zeitraum einen ähnlichen Verlauf (Korrelation).



Korrelation der Messparameter für Phagozytoseaktivität an HL60-Zellen

Abb. 39: Lineare Korrelation der Messparameter Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) von HL 60-Zellen mit 95 %igen Konfidenzintervallen bei 37 °C. Eine lineare Korrelation kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 0,1% angenommen werden.

Beide Messparameter befinden sich in einem Versuchszeitraum von 0,5 bis 6 h in einer linearen Anstiegsphase bei 37 °C. Temperatureinflüsse auf die Phagozytoseaktivität wurden für dieses Zeitintervall ermittelt (siehe Kap. 3.1.1.4).



Abb. 40 und 41: Zeitlicher Verlauf der Messparameter Phagozytoseanteil (links) und Phagozytoseleistung (GE) (rechts) von HL 60-Zellen bei 37 °C. Die Messungen erfolgten im Dreifachansatz, der mittlere prozentuale Variationskoeffizient des Phagozytoseanteils beträgt 7% und der Phagozytoseleistung (GE) 12%.

3.1.1.3 Kinetik der Fluoreszenzzunahme durch Phagozytoseakivität von HL 60-Zellen

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität und die Besetzung der einzelnen Aufnahmeklassen folgt einem zeitlichem Verlauf, der auf der folgenden Abbildung zu erkennen ist.



Abb. 42: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzzunahme von HL 60-Zellen durch Phagozytoseaktivität bei 37 °C.

Die einzelnen Aufnahmeklassen werden mit zunehmender Versuchszeit häufiger besetzt. Auch findet eine Verschiebung der Klassenzusammensetzung zugunsten der Aufnahmeklassen mit mehreren Latexpartikeln pro Hämozyt statt. Es wurde anschließend die Korrelation der Messparameter Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) untersucht.



3.1.1.4 Temperatureinfluss auf die Phagozytoseakivität von HL 60-Zellen

Abb. 43: Einfluss unterschiedlicher Versuchstemperaturen auf den Phagozytoseanteil in Zeitabhängigkeit. Der mittlere prozentuale Vk bei einer Dreifachbestimmung und einer Versuchstemperatur bei 37 °C liegt bei 6%.

Eine Abweichung von der Versuchstemperatur führt bei HL 60-Zellen zu einer drastischen Verringerung der Phagozytoseanteile. Die HL 60-Zellen sind physiologisch optimal an 37 °C angepasst und reagieren bei einer Verringerung der Versuchstemperatur empfindlich mit Reduzierung ihrer Phagozytoseaktivität.

3.1.1.5 Differenzierungsproblematik und Verwendung von P388-Mausmakrophagen

Die prämyeloischen HL 60-Zellen können durch verschiedene Reagenzien in die Zelltypen Granulozyten, Monozyten, makrophagenähnliche Zellen differenziert werden (siehe Abb. 11 in Kap. 2.2.1 und Kap. 2.2.6) und erlangen erst durch den Zusatz bestimmter Differenzierungsstimuli ihre Phagozytoseaktivität [119]. Nachdem die Messparameter erabeitet waren, konnte nach Stimuliversuchen in der Diplomarbeit von Denise Spira [105] kein gleichbleibendes Ausgangsniveau der Phagozytoseaktivität mit den HL 60-Zellen erreicht werden. Eine Alternativmethode mit phagozytoseaktiven P388-Mausmakrophagen wurde entwickelt, auf die die Messparameter erfolgreich übertragen werden konnten und auch *In vitro* Hemmversuche (siehe Kap. 3.2.1) durchgeführt wurden. Verschiedene Fragestellungen wurden mit dieser adhärenten Zelllinie, die auf Phagozytoseprozesse spezialisiert ist, bearbeitet. Auf Probleme im Umgang mit beiden Zelllinien wird ebenfalls in [105] eingegangen.

3.1.2 Hämolymphgewinnung aus Muscheln

Von März 2005 bis März 2007 wurden 438 Punktionen an Muscheln in der Rheinwasserhälterung durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen Punktionsvolumina und die vitalen Hämozytenzahlen dieser Punktionen.



Abb. 44 und 45: Punktionsvolumina (n=431) und vitale Hämozytendichten (n=388) von Entenmuscheln aus der Rheinwasserhälterung. Der mittlere prozentuale Vk beträgt für das Punktionsvolumen 54% und 56% für die vitale Hämozytendichte, die nach Trypanblaufärbung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde.

Auf mögliche Ursachen der erheblichen Schwankungen der Punktionsvolumina wird in Kap. 3.1.4.1 im Zusammenhang mit den Punktionsfolgen eingegangen. Die Variabilität der vitalen Hämozytendichten kann zumindest teilweise durch saisonale Schwankungen erklärt werden (siehe Kap. 4.4.2).

Vergleich Zählung der Neubauer-Zählkammer mit der Coulter Counter Messung

Zur Absicherung der Befunde in der vitalen Hämozytendichte gegenüber methodenspezifischen Fehlern wurde eine automatische Partikelzähltechnik parallel ausgetestet. Diese Methode bestimmt auch Zelltrümmer und Gewebebestandteile mit, doch wurde ein Größenfenster zwischen 6-20 µm gewählt, in dem vorwiegend Hämozyten erfasst wurden (siehe Abb. 57 in Kap. 3.1.3). In der Trypanblaufärbung wurden nur Hämozyten mit einer intakten Membran bestimmt, wobei Hämozytenaggregationen bis zu einer Hämozytenzahl von 3 berücksichtigt worden sind.



Abb. 46: Korrelation der Messergebnisse der Zellzahlbestimmungen nach Zählung in der Neubauerzählkammer mit Trypanblaufärbung und Coulter Counter Messung (n=66). Eine signifikante Korrelation kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 0,1 % angenommen werden (siehe Kap. 6.2)

Beide Methoden zeigten eine signifikante lineare Korrelation. Da nur vitale Hämozyten zur Phagozytose befähigt sind, wurde die Zählung in der Neubauerkammer als Grundlage für die Testansätze verwendet.

3.1.3 Zusammensetzung der Hämolymphe

Mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass morphologisch mindestens 2 Subpopulationen der Hämozyten klassifiziert werden können. Es handelt sich um kleinere granuläre Hämozyten und etwas größere agranuläre Hämozyten (7,5µm gegenüber 11 µm mittlerer Zelldurchmesser).



Abb. 47: Größenverhältnisse von granulären und agranulären Hämozyten nach mikroskopischer Messung von ca. 100 Hämozyten aus 4 verschiedenen Individuen. Die mittlere prozentualen Variationskoeffizienten betragen 21% für die granulären Hämozyten und 30% für die agranulären Hämozyten.

Die Größenklassen korrelierten häufig auch mit dem granulären Anteil der Hämozyten. Durch eine Pappenheim-Färbungen der Hämozyten erkennt man Unterschiede und auch Übergänge im Kernanteil und der Granularität der Hämozyten. Auch lässt sich das ausgeprägte Aggregations- und Adhäsionsverhalten der Zellen erkennen.



Abb. 48- 52: Hämozyten aus Anodontenhämolymphe nach Pappenheim-Färbung

Durchflusszytometrisch waren die Unterschiede beider Hämozytenpopulationen durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht nicht voneinander zu unterscheiden. Die Übergänge zwischen der granulären und agranulären Form sind für diese Messtechnik zu fließend, auch findet man eine Überlappung beider Größenpopulationen (siehe Abb. 47 und 57). Granuläre und agranuläre Hämozyten sind zu hohen Aufnahmeleistungen an fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln befähigt, siehe folgende Abbildungsbeispiele:





Abb. 53-56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von granulären (links) und agranulären (rechts) Hämozyten nach 20 h Phagozytoseaktivität mit einer fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln.

Eine Größenklassifizierung der Hämozyten konnte auch durch Coulter Counter Messungen bestätigt werden, wobei jedoch die Anteile beider Hämozytensubpopulationen individuell stark schwanken können. Der hohe Trümmeranteil ist im Größenbereich < 5 µm zu erkennen.



Abb. 57: Beispiel einer Hämozytengrößenverteilung in Hämolymphe eine Stunde nach der Punktion durch Coulter-Counter-Messung.

3.1.4 Punktionsfolgen

3.1.4.1 Degeneration des vorderen Schließmuskels

Durch den vermehrten Hämozytenbedarf in der Methodenentwicklung und durch die vergleichsweise geringen Hämozytendichten bedingt waren Mehrfachpunktionen der Teichmuscheln in der Rheinwasserhälterung notwendig. Die dabei benötigten Erholungsphasen von 3 Wochen für eine vollständige Regeneration der Phagozytoseaktivität und der vitalen Hämozytendichte (siehe Kap. 3.1.4.4) wurden berücksichtigt, doch kam es zu erheblichen Degenerationserscheinungen des vorderen Schließmuskels nach Mehrfachpunktionen. Die folgenden Abbildungen zeigen den Verlauf dieser Degenerationen.



Abb. 58: Intakter Schließmuskel vor der Punktion



Abb. 60: Schließmuskel nach dreifacher Punktion



Abb. 59: Schließmuskel nach zweifacher Punktion



Abb. 61: Schließmuskel nach vierfacher Punktion

Mittlerweile besteht allgemeiner Konsens, dass Hämozyten den Hauptbeitrag zur Verteidigung gegen mikrobielle und parasitäre Angriffe leisten [26]. Durch das Absaugen der Hämozyten bei der Punktion wird der Muschel die Möglichkeit genommen auf den Eintrag von Pathogenen mit Wundverschluss und Immunantwort zu reagieren [25]. Es kommt zu großflächigen Degenerationen des Muskelgewebes um die Einstichstellen. Auch weitere Punktionen können davon beeinflusst werden. Da das zur Verfügung stehende Muskelgewebe kleiner wird und weniger Hämolymphe nachströmen kann, erklärt dies eine Reduzierung der gewinnfähigen Punktionsvolumina.

In der Rheinwasserhälterung war die Mortalitätsrate in den Wintermonaten höher, besonders in den kälteren Monaten kam es in der Rheinwasserhälterung häufig zu Ausfällen der Versuchstiere. Eine Versuchsgruppe von 43 Entenmuscheln wurde von KW 16 bis KW 52 im

Jahr 2006 im Mittel 3,7 mal unter Berücksichtigung der minimalen Regenerationsintervalle von 3 Wochen punktiert. 58% der Versuchstiere fielen in diesem Zeitraum für die Hämolymphgewinnung aus und 47% waren nach der KW 52 verstorben.

3.1.4.2 Eintrag von Mikroorganismen in die Einstichstelle

Bei der Punktion des vorderen Schließmuskels entsteht durch den Eintritt der Kanüle (\emptyset = 0,6 mm) neben einer Läsion auch ein Eintrag von Mikroorganismen, da ein Teil des auf dem Muskel sitzenden Biofilms in den Muskel gestanzt wird. Ein Plattierungsversuch bei 30 Grad Celsius und einer Versuchszeit von 4 Tagen konnte dieses zeigen.



Abb. 62 und 63: Plattierungsversuch mit jeweils 100 µl Muskelabschabungssuspension vom vorderen Schließmuskel von *Anodonta anatina.*



Abb. 64 und 65: Plattierungsversuch mit jeweils 100 µl Hämolymphe aus dem vorderen Schließmuskel von *Anodonta anatina*.



Abb. 66: Kontroll-Plattierungsversuch mit 100 µl Anodontenpuffer

3.1.4.3 Vitalitätsabnahme der Hämozyten in der Primärkultur

Die Möglichkeit, Hämozyten in Primärkultur zu nehmen, wurde getestet. Dazu wurde Hämolymphe von 7 Individuen bei Raumtemperatur in Dunkelheit aufbewahrt und die vitale Hämozytendichte durch Zählung in der Neubauer-Zählkammer mit Trypanblaufärbung nach 3 und 6 Tagen bestimmt.



Abb. 67: Rückgang der vitalen Hämozytendichte mit zunehmender Standzeit. Die Aufbewahrung der Hämolymphen erfolgte dunkel bei 25 °C. Vor den Zellzahlbestimmungen wurden die Hämolymphen für 3 s bei 2500 U/min geschüttelt. Die Vitalität wurde durch Doppelbestimmung nach Trypanblaufärbung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt, der mittlere prozentuale Vk beträgt 4%.

Die Abnahme der vitalen Hämozytendichte ist bereits nach 3 Tagen zu erkennen, die mittlere relative Hämozytendichte fällt auf unter 35% zur Ausgangsdichte, nach 6 Tagen wird noch 15% der Ausgangsdichte erreicht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weitere Versuche die Hämozyten in Primärkultur zu nehmen, verworfen. Auch zeigte sich nach 6 Tagen ein erheblicher Rückgang der Phagozytoseaktivität der Hämozyten.



Abb. 68: Rückgang der Phagozytoseleistung nach 6 d Standzeit der Hämolymphen.

Da die Vitalität der Hämolymphen stark herabgesetzt wurde, konnten Phagozytoseleistungen nach 6 d nur von 3 Hämolymphen, mit ausreichender Hämozytenzahl, im Dreifachansatz bestimmt werden. Die mittlere prozentuale Abweichung beträgt zum Zeitpunkt 0 Tage 7% und zum Zeitpunkt 6 Tage 20%.

3.1.4.4 Bestimmung der Regenerationsfähigkeit der Messparameter Phagozytoseleistung und mittlerer vitaler Hämozytendichte nach erfolgter Punktion

Um ein minimales Punktionsintervall benutzen zu können, nachdem die Immunparameter ein vergleichbares Niveau gegenüber dem Augangszustand besitzen, wurden die Messparameter in verschiedenen Zeitabständen nach der Punktion getestet.



Abb. 69: Regeneration der Phagozytoseleistung. Dargestellt sind 56 Phagozytoseleistungsmessungen von 11 Individuen nach einem Punktionsintervall von 3 Wochen. Der Mittelwert der Phagozytoseleistungen der Erstpunktion beträgt 9,0 Beads/Hämozyt mit einem prozentualen Vk von 39%. Der Mittelwert der Phagozytoseleistungen der Zweitpunktion beträgt 8,5 Beads/Hämozyt mit einem przentualen Vk von 53%. Mit dem Mann-Whitney-U-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Phagozytoseleistung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit ≤ 5% gefunden werden.

Die Phagozytoseleistung ist im Abstand von 3 Wochen vollständig regeneriert. Da Phagozytoseleistung und Phagozytoseanteil miteinander im chemisch unbelasteten Zustand korrelieren, ist von einer Regeneration der Phagozytoseaktivität auszugehen. Das Regenerationsintervall war auch ausreichend, um die vitalen Hämozytendichten zu regenerieren.



Abb. 70: Regeneration der vitalen Hämozytendichten. Dargestellt sind 22 vitale Hämozytendichten von 11 Individuen nach einem Punktionsintervall von 3 Wochen. Der Mittelwert der vitalen Hämozytendichte beträgt 5,27 x 10⁵ Hämozyten/ml bei der Erstpunktion mit einem prozentualen Vk von 47%. Der Mittelwert der vitalen Hämozytendichte der Zweitpunktion beträgt 5,53 x 10⁵ Hämozyten/ml mit einem prozentualen Vk von 32%. Mit dem Mann-Whitney-U-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Phagozytoseleistung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit \leq 5% gefunden werden.

3.1.5 Adhäsionsverhalten der Hämozyten

Das Adhäsionsverhalten der Hämozyten direkt nach der Punktion wurde an Einzel- und Mischhämolymphe aus 4 Individuen und an verschiedenen Materialien wie Polystyrol (PS) und Polyethylen bei Raumtemperatur mit der Zählung in der Neubauer-Zählkammer getestet.



Abb. 71: Adhäsionsversuch mit Einzel- und Mischhämolymphe an Polystyrol und Polyethylen. Die Hämozytendichte wurde mit der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblaufärbung im Doppelansatz bestimmt. Der mittlere prozentuale Vk beträgt 8%.

Bereits nach 1h Versuchszeit hat die zählbare Hämozytenzahl beträchtlich abgenommen und fällt auf ein Niveau von unter 65% gegenüber der Ausgangsdichte unter allen Versuchsbedingungen. Nach 6 h Versuchszeit ist das Adhäsionsverhalten stark ausgeprägt, es werden niedrigere Hämozytendichten als nach 1 h gefunden. Zum Zeitpunkt von 24 h werden meist höhere Hämozytendichten als zum Zeitpunkt nach der Punktion gefunden, was die Geschwindigkeit des Adhäsionsverhaltens verdeutlicht. Wenige Minuten nach der Entnahme ist schon ein Teil der Hämozyten durch Adhäsionen und Aggregationen nicht mehr zählbar. Nach 24 h wird in Polystyrolgefäßen eine erheblich höhere Hämozytendichte gegenüber dem Ausgangslevel als in Polyethylengefäßen gemessen, was auf die geringere Adhäsionsfähigkeit der Hämozyten zurückzuführen ist. Signifikante Unterschiede zwischen Einzel- und Mischhämolymphe konnten in diesem Versuch nicht erfasst werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich für durchflusszytometrische Messungen ableiten, dass Polystyrolgefäße gegenüber Polyethylen zu bevorzugen sind und der Anteil der nachweisbaren Hämozyten erst zwischen 6 und 24 h ein ähnliches Niveau wie direkt nach der Punktion erreicht, was bei den vergleichsweise geringen Hämozytendichten der Entenmuscheln sich positiv auf statistische Betrachtungen auswirkt (siehe Abb. 77 in Kap. 3.1.6.4).

3.1.6 Methodische Einflüsse auf die Phagozytoseaktivität von Hämozyten

3.1.6.1 Relativer Einfluss einer Veränderung der Hämozytenzahl auf die durchflusszytometrische Messung

Verschiedene Hämozytenzahlen wurden im Testansatz mit Mischhämolymphe getestet und ausgewertet.



Abb. 72: Relativer Einfluss einer Veränderung der Hämozytenzahl gegenüber 50000 Hämozyten. Die Messungen erfolgten an 9 Versuchstagen mit jeweils 3 Parallelbestimmungen (n=27). Die Mischhämolymphe wurde aus insgesamt 60 Muscheln der Rheinwasserhälterung entnommen.

Mit zunehmender Hämozytenzahl steigen auch die nachweisbaren Ereigniszahlen für Negativ-, Positiv und Totalereignisse. Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung sind ebenfalls von der Hämozytenzahl im Testansatz abhängig, es findet von Hämozytenzahlen 12500 bis 50000 eine kontinuierliche Steigerung der Phagozytoseaktivität statt. Erst bei 100000 Hämozyten fällt die Phagozytoseaktivität unter das Level von 50000 Hämozyten im Testansatz. Die Phagozytoseeigenschaften lassen sich durch eine Erhöhung der Hämozytendichte im Testansatz nicht beliebig verstärken. Eine Hämozytenzahl von 50000 im Testansatz zeigt optimale Phagozytoseaktivität bei einem vetretbaren Hämozyteneinsatz, mit 150000 Hämozyten ist eine Dreifachbestimmung möglich, ein Wert, der bei Punktionen nahezu immer erreicht wurde (siehe Abb. 44 und 45 in Kap. 3.1.2).

Die Ursache für die Reduzierung der Phagozytoseaktivität bei geringer Hämozytenzahl sollte in Folgeversuchen ermittelt werden. Eine mögliche Ursache ist eine Variation des Serumanteils im Testansatz, der bedingt durch die Hämozytendichte der Hämolymphe im Testansatz abnimmt. Der 12500 Hämozytenansatz zeigte die geringste Phagozytoseaktivität und wurde daher im Vergleich mit doppelten Serumanteil getestet. Der zusätzliche Serumanteil konnte zellfrei durch Zentrifugation der Hämolymphe gewonnen werden.

3.1.6.2 Relativer Einfluss einer Erhöhung des Serumanteils (Opsonisierung) und zusätzlicher Verdopplung des Beadanteils auf durchflusszytometrische Messparameter im 12500 Hämozytenansatz



Abb. 73: Relativer Einfluss einer Veränderung des Serumanteils und des Beadanteils im 12500 Hämozytenansatz. Die Messungen erfolgten an 3 Versuchstagen mit jeweils 3 Parallelbestimmungen (n=9), die Mischhämolymphe wurde aus insgesamt 19 Muscheln der Rheinwasserhälterung entnommen.

Eine Erhöhung des Serumanteils führte zu einer geringfügigen Erhöhung der Phagozytoseleistung und des Phagozytoseanteils. Inhaltsstoffe im Serum scheinen eine opsonisierende Wirkung zu besitzen und fördern Phagozytoseprozesse. Wesentlich stärker fällt aber zusätzlich eine Verdopplung der zur Verfügung stehenden Latexpartikel im Testansatz aus, was zu einer mehr als 80 %igen Steigerung der Phagozytoseleistung führte. Da die Hämozytendichten starken Schwankungen unterliegen (siehe Abb. 45 in Kap. 3.1.2), sollten auch Einfllussmöglichkeiten des Serumanteils auf den 50000 Hämozytenansatz weiterführend beschrieben werden. 3.1.6.3 Relativer Einfluss einer Erhöhung des Serumanteils (Opsonisierung) und zusätzlicher Verdopplung des Beadanteils auf durchflusszytometrische Messpa rameter im 50000 Hämozytenansatz



Abb. 74: Relativer Einfluss einer Veränderung des Serumanteils und des Beadanteils im 50000 Hämozytenansatz. Die Messungen erfolgten an 3 Versuchstagen mit jeweils 3 Parallelbestimmungen (n=9), die Mischhämolymphe wurde aus insgesamt 33 Muscheln der Rheinwasserhälterung entnommen.

Eine Erhöhung des Serumanteils führte zu einer Verringerung der Phagozytoseleistung und des Phagozytoseanteils. Eine zusätzliche Verdopplung der Latexpartikelkonzentration im Testansatz konnte dieser Reduzierung zwar entgegen wirken, aber nicht vollständig ausgleichen. Die Phagozytoseeigenschaften im 50000 Hämozytenansatz lassen sich durch eine Erhöhung des Serumanteils und der Partikelkonzentration nicht steigern. Eine mögliche Ursache kann sein, dass bei zu hohen Serumanteilen der Fremdcharakter des umgebenden Milieus nicht mehr ausreichend von den Hämozyten erkannt wird und sie ihre Phagozytoseaktivität zusätzlich steigern lassen. Der 50000 Hämozytenansatz hat sich durch hohe Phagozytoseaktivitäten (siehe Abb. 72 in Kap. 3.1.6.1) für weitere Kinetikuntersuchungen bewährt und wurde für alle Folgeuntersuchungen beibehalten.

3.1.6.4 Kinetik von Phagozytoseaktivität und Adhäsion von Hämozyten

Die folgenden Abbildungen zeigen die Kinetik von Einzelhämolymphe von Entenmuscheln aus der Laborhälterung bei 21 °C zu verschiedenen Versuchszeitpunkten. Die Versuche fanden bei 25 °C in Dunkelheit statt. Die Hämozyten wurden jedoch vor der durchflusszytometrischen Messung nicht trypsiniert.



Abb. 75 und 76: Zeitlicher Verlauf der Messparameter Phagozytoseanteil (links) und Phagozytoseleistung (rechts) von Einzelhämolymphe bei 25 °C aus der Laborhälterung untrypsiniert. Die Messungen erfolgten im Dreifachansatz, der mittlere prozentuale Vk beträgt 5% für den Phagozytoseanteil und 14% für die Phagozytoseleistung.

Beide Messparameter nehmen bis zum Zeitpunkt von 20 h kontinuierlich zu, was auf die Phagozytoseaktivität der Hämozyten zurückzuführen ist. Auffallend ist der unterschiedliche Anstiegscharakter von Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung. Besonders zu den



Abb. 77: Kinetikverläufe des Messparameters Anzahl der Ereignisse in Hämozytengröße von Einzelhämolymphe bei 25 °C aus der prozentuale Vk beträgt 9%.

Zeitpunkten 1 und 2 h liegen die Phagozytoseanteile relativ gesehen höher als die entsprechenden Phagozytoseleistungen, was z.B. durch unspezifisch angelagerte, aber noch nicht aufgenommene Partikel bedingt sein kann. In den ersten Stunden ist das Adhäsionsverhalten besonders stark ausgeprägt (siehe Abb. 71 in Kap. 3.1.5), was sich an der Anzahl der durchflusszytometrisch nachweisbaren Menge an Ereignissen im Hämozytengrößenbereich zeigen lässt (siehe Abb. 77).

Die Anzahl der nachweisbaren Ereignisse wird durch die Versuchszeit variiert. Mit zunehmender Versuchszeit steigt der Anteil der nachweisbaren Ereignisse, was auf eine Reduzierung der Adhäsions-und Aggregationsfähigkeit der Hämozyten Laborhälterung untrypsiniert. Die Messungen zurückzuführen ist. Von 5 x 10⁴ eingesetzten erfolgten im Dreifachansatz, der mittlere Hämozyten im Testansatz können erst nach 20 h mehr als die Hälfte bestimmt werden. Zu den
Zeitpunkten 1 und 2 h ist gerade ein Fünftel nachweisbar. Für statistisch aussagefähigere Messungen sind längere Versuchszeiten, z.B. 20 h vorzuziehen. Trypsinisierungen der Testansätze führten zu gleichmäßigeren Anstiegen der Messparameter Phagozytoseanteil und und Phagozytoseleistung (GE) in kürzeren Messintervallen (siehe Kap. 3.1.6.6) und erhöhten auch den Anteil der bestimmbaren Ereignisse.

3.1.6.5 Temperatureinfluss auf die Phagozytosekinetik von Muschelhämozyten

Die im Testansatz verwendeten Hämozyten stammen aus Organismen, die an ihre Umgebungstemperatur angepasst sind. Um Temperaturadaptationseinflüsse der Hämozyten in ihrer Phagozytoseaktivität anzuzeigen, wurden Entenmuscheln aus unterschiedlichen Hälterungsbedingungen punktiert und die gewonnenen Hämozyten bei 25 °C auf ihre Phagozytoseaktivität getestet.



Abb. 78: Einfluss der Hälterungswassertemperaturen auf die Phagozytoseleistung. Pro Individuum wurde ein Dreifachansatz zu den Zeitintervallen 1, 2, 4 und 6 h.gewählt. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 11%.

Der zeitliche Verlauf der Phagozytoseleistung zeigt, dass die Hämozyten von Entenmuscheln aus Hälterungen mit höheren Temperaturen eine bessere Partikelaufnahme zum gleichem Zeitpunkt bei der Versuchstemperatur von 25 °C besitzen, als Hämoyten von Anodonten, die an niedrigere Temperaturen angepasst waren. Je näher die Adaptationstemperatur an der Versuchstemperatur lag, desto besser waren die Phagozytoseleistungen. Die Q₁₀-Werte für unterschiedliche Hälterungstemperaturen, nach der RGT-Regel bei einer Versuchszeit von 6h wurden nach folgender Formel berechnet. :

$$\mathbf{Q_{10}} = \left(\frac{\text{PL}(\text{GE})_{\text{T}_2}}{\text{PL}(\text{GE})_{\text{T}_1}}\right)^{10/(\text{T}_2\text{-T}_1)}$$

Abb. 79: Formel der Q₁₀-Wert Berechnung

Bei einer Hälterungstemperaturänderung von 7,8 °C auf 15 °C, errechnet sich ein Q_{10} -Wert von 1,91. Bei einer Hälterungstemperaturänderung von 11,2 auf 21,2 °C, errechnet sich ein Q_{10} -Wert von 1,48. Auch bei einer konstanten Versuchtemperatur von 25 °C für 6h Versuchszeit, ist ein Einfluss der Hälterungstemperaturen zu errechnen, der ausgeprägter in niedrigeren Temperaturbereichen ist.



Abb. 80: Einfluss der Hälterungswassertemperaturen auf den Phagozytoseanteil. Pro Individuum wurde ein Dreifachansatz zu den Zeitintervallen 1, 2, 4 und 6 h gewählt. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 3%.

Der zeitliche Verlauf des Phagozytoseanteils verhält sich analog zur Phagozytoseleistung. Die Ergebnisse für die Messparameter Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung wurden anschließend Korrelationsanalysen unterzogen.

3.1.6.6 Korrelation der Messparameter bei unterschiedlichen Hälterungstemperaturen

Die Einführung der Trypsinisierung der Hämozyten als Testansatzvorbehandlung führte unter allen untersuchten Hälterungsbedingungen zu einer guten Korrelation der Messparameter im Versuchszeitraum von 6h.



Abb. 81 und 82: Korrelation zwischen den Messparametern Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) zu den Zeitpunkten 1,2,4 und 6h, bei einer Hälterungstemperatur von 7,8 °C (linke Abb.) und 11,2 °C im Rheinwasser (rechte Abb.).



Abb. 83 und 84: Korrelation zwischen den Messparametern Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) zu den Zeitpunkten 1,2,4 und 6h, bei einer Hälterungstemperatur von 15 °C im Labor (linke Abb.) und 21,2 °C im Rheinwasser (rechte Abb.).

Unter ungehemmten Bedingungen und unter Berücksichtigung der Anstiegsphasen kann sowohl der Phagozytoseanteil als auch die Phagozytoseleistung als Maß für die Phagozytoseaktivität genommen werden. Die einzelnen Korrelationen lassen sich auch durch eine lineare Gesamtkorrelation beschreiben.



Abb. 85: Korrelation zwischen den Messparametern Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) zu den Zeitpunkten 1,2,4 und 6h, bei verschiedenen Hälterungstemperaturen mit 95 %igen Konfidenzintervallen. Eine Korrelation kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 0,1% angenommen werden.

Neben der Hälterungstemperatur der Entenmuscheln beeinflusst die Versuchstemperatur die Phagozytoseaktivität und wurde deshalb als weitere methodische Einflussgröße untersucht. Unabhängig von den den untersuchten Hälterungstemperaturen können Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung unter unbelasteten Bedingungen als Maß für die Phagozytoseaktivität verwendet werden.



3.1.6.7 Temperatureinfluss der Versuchstemperatur auf die Phagozytoseaktivität von unterschiedlich adaptierten Entenmuscheln

Abb. 86: Einfluss unterschiedlicher Versuchstemperaturen auf die Phagozytoseleistung von Mischhämolymphe aus Entenmuscheln unterschiedlicher Hälterungsbedingungen. Die Mischhämolymphe wurde aus je vier Individuen generiert. Jede Testbedingung wurde im Vierfachansatz nach 20h Versuchszeit getestet, der mittlere prozentuale Vk beträgt 8%.

In einem Temperaturbereich von 4 bis 25 °C lässt sich eine Steigerung der Phagozytoseaktivität mit zunehmender Versuchstemperatur beobachten. Das Steigerungspotenzial der Phagozytoseleistung ist bei den Hämozyten, die von den Muscheln aus Laborhälterung bei 21 °C gegenüber der von Versuchtieren, die aus der Rheinwasserhälterung bei 6,2 °C stammen, wesentlich höher. Sie erreichen eine nahezu doppelt so hohe Phagozytoseleistung bei 25 °C. Bei 25 °C wurden die höchten Phagozytoseaktivitäten gefunden, diese Versuchstemperatur wurde für Folgeversuche beibehalten. Bei für Muscheln unphysiologischen 37 °C bricht die Phagozytoseleistung beider Mischhämolymphen ein. Erneut zeigt sich, dass Muscheln, die an eine höhere physiologisch relevante Temperatur adaptiert worden sind, bessere Phagozytoseaktivitäten aufweisen (siehe Abb. 78 und 80 in Kap. 3.1.6.5). Für weitere Versuche wurde daher bevorzugt Hämolymphe von Entenmuscheln aus der Laborhälterung bei 22 \pm 3 °C verwendet.

3.1.6.8 Einfluss von generellen Versuchsbedingungen auf die Phagozytoseaktivität von Immunzellen

Aus den Kinetik- und Temperaturversuchen mit den unterschiedlichen Immunzellen haben sich Versuchsbedingungen der Testansätze ableiten lassen, bei denen die Phagozytoseaktivität gut bestimmt werden kann. Um eine gleichmäßige Verteilung der Latexpartikel im Testansatz und damit eine gleichmäßige Aufnahmemöglichkeit der Latexpartikel zu gewährleisten, wurde während der Inkubation eine moderate Schüttelbedingung für die Testansätze gewählt. Die Dichte der Latexpartikel beträgt 1,055 g/cm³, so dass eine langsame Sedimentation und damit heterogene Verteilung im Testansatz stattfinden würde. Hingegen reagierte die adhärente Zelllinie der P388-Mausmakrophagen auf Schüttelbedingungen mit einer Verminderung ihrer Phagozytoseaktivität.

Immunzellen	Typus	Versuchs- temperatur	Versuchs- zeit	Reaktions- gefäß	Schüttel- bedingung
Differenzierte HL 60-Zellen	Suspensions- kultur	37 °C	4h	1,5 ml PE- Eppendorfgefäß	150 U/min, Rotation, Auslenkung 1 cm
Muschel- hämozyten	nativ in Sus- pension, nach Punktion überwiegend adhärent	25 °C	20h	5 ml PS- Röhrchen	150 U/min, Rotation, Auslenkung 1 cm
P388- Mausmakro- phagen	Adhäsions- kultur	37 °C	3h	6-Well- Mikrotiterplatte für adhärente Zellen	Kein Schüt- teln

Tab. 13: Versuchsbedingungen unterschiedlicher Immunzellen im Phagozytoseansatz

3.1.7 Vitalitätsergebnisse

Neben der vitalen Hämozytendichte nach der Punktion wurde der nekrotische Zellanteil nach dem Phagozytoseprozess als weiterer Messparameter mit Propidiumjodid und Sytox-Green-Färbungen an Muschelhämozyten aufgenommen, um Aussagen über den Vitalitätsverlust von Hämozyten treffen zu können.



Abb. 87: Ergebnisse der Vitalitätsfärbungen von Mischhämolymphe mit Sytox-Green und Propidiumjodid (PJ) nach 20h Exposition von NiCl₂. Die Messungen erfolgten im Dreifachansatz, der mittlere prozentuale Vk liegt zwischen 11 und 13%.

Die Vitalitätsfärbungen beider Methoden zeigen größere Schwankungen als die Vitalitätsfärbungen von Säugerimmunzellen. Der Auflösungsbereich fällt sehr gering aus und liegt zwischen 7 und 27% Nekroseanteil. Durch das wesentlich inhomogenere Ausgangsmaterial sind nekrotische Zellanteile an Muschelhämozyten schwerer zu bestimmen. Die Sytox-Green-Färbung kam jedoch *in vivo* bei den Abwasserexpositionen zum Einsatz (siehe Kap. 3.4).

3.1.8 ROS-Produktion von Muschelhämozyten

3.1.8.1 Zusammenhang zwischen H_20_2 -Stoffmenge im Testansatz und der Extinktion in der Phenolrotmethode

Wasserstoffperoxid ist die stabilste unter den reaktiven Sauerstoffspezies. Die unspezifisch wirkende Meerrettichperoxidase, die zu den Oxidoreduktasen gehört, oxidiert das im Testansatz befindliche Phenolrot in einer Dehydrogenierungsreaktion (siehe Kap. 2.4.7); dabei wird Wasserstoffperoxid zu Wasser umgesetzt. Die Oxidation des Phenolrots bewirkt eine lineare Extinktionserhöhung.



Abb. 88: Dargestellt sind die E₅₉₅-Werte bei Zugabe unterschiedlicher H₂O₂-Stoffmengen im Testansatz zwischen 0,55 µmol und 15 µmol mit 95 %igen Konfidenzintervallen. Es wurden 20 Stoffmengen in diesem Bereich doppelt bestimmt, der mittlere prozentuale Vk beträgt 0,7%. Die allgemeine Funktionsgleichung für diesen Zusammenhang lautet: E₅₉₅ = 0,01146 x xµmol H₂O₂ + 0,3117. Oberhalb des getesteten Stoffmengenbereichs verliert die Methode durch die Säurewirkung des H₂O₂, welches einen Farbumschlag des Phenolrots bewirkt, ihre lineare Korrelation.

Durch den linearen Zusammenhang zwischen Wasserstoffperoxidstoffmenge und Extinktionsänderung kann im Testansatz mit Muschelhämozyten bei gleichbleibendem pH-Wert aus der Extinktionsänderung die Produktion an H_2O_2 -Radikaläquivalenten pro Zeiteinheit errechnet werden. Dabei ist die Radikalproduktion von der Versuchszeit und von der Hämozytenzahl im Testansatz abhängig (siehe Abb. 89 und 90 in Kap. 3.1.8.2).

Eine Erweiterung des Messbereichs für H_2O_2 kann zwar bis auf 60 µmoll/l im Testansatz erfolgen [64], indem vor der Messung der pH-Wert durch Zugabe von Natronlauge angehoben wird. Doch zeigten sich lineare Korrelationen der Hämozytenzahlen und der Versuchszeit mit den Extinktionsänderungen bis zu einer Versuchzeit von 16 h (siehe Abb. 90 in Kap. 3.1.8.2). Da für Phenolrot keine toxischen Effekte nachgewiesen sind, kann so eine kontinuierliche Messung der ROS-Produktion erfolgen.



3.1.8.2 Kinetikverlauf der ROS-Produktion in Abhängigkeit von der Hämozytenzahl im Testansatz

Abb. 89: ROS-Produktionen von Mischhämolymphe in µmol H_2O_2 -Radikaläquivalenten mit unterschiedlichen Hämozytenzahlen im Testansatz. Jede Bedingung wurde zweimal als Doppelansatz getestet, der mittlere prozentuale Vk beträgt 1,2%. Es wurde in 30-minütigen Intervallen über einen Zeitraum von 19 h gemessen.

Mit einer Reduzierung der Hämozytenzahl im Testansatz nimmt die Radikalproduktion ab. Der Kontrollansatz mit Anodontenpuffer zeigte in den ersten Messintervallen einen geringfügigen Ausschlag, was durch die Durchmischung des Testansatzes und den erhöhten Kontakt mit dem Luftsauerstoff zu erklären ist. Die Radikalproduktion nimmt mit zunehmender Versuchszeit ab. 50000 Hämozyten erzeugen eine gut quantifizierbare Messgröße für einen langen Versuchszeitraum. Zum Zeitpunkt von 12 h Versuchszeit wird noch über 1 µmol Radikaläquivalente pro h im Testansatz produziert. In der folgenden Abbildung wurde die Linearität der Radikalproduktion zur Hämozytenzahl im Testansatz und zur Versuchsdauer dargestellt.



Abb. 90: Mittlere ROS-Produktionen von Mischhämolymphe in µmol H_2O_2 -Radikaläquivalenten mit unterschiedlichen Hämozytenzahlen im Testansatz in den Zeitintervallen 0-4 h, 4-8 h, 8-12 h und 12-16 h.

Die ROS-Produktion ist proportional zur Hämozytenzahl pro Kavität und nimmt mit zunehmender Versuchzeit kontinuierlich ab. Dabei liegt die Halbwertszeit der ROS-Produktion bei 4 h bei Raumtemperatur. Von 50000 Hämozyten im Testansatz wurden im Mittel zwischen 0 und 4 h ca. 5 µmol H₂O₂-Radikaläquivalente/h gebildet, zwischen 4-8 h ca. 2,5, zwischen 8-12 h ca. 1,25 und zwischen 12 und 16 h ca. 0,625.

In weiteren Versuchen wurde die Stimulationsfähigkeit der ROS-Produktion der Hämozyten gegenüber phagozytosefähigen Partikeln untersucht, da bekannt ist, dass ein Teil der ROS-Antwort von Muschelhämozyten mit Phagozytoseprozessen assoziiert sein kann [120]. Es wurden daher fluoreszenzmarkierte Latexpartikel und mit Fluoresceinisothiocyanat konjugierte *E. coli*-Bakterien als Stimuli in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Neben diesen Versuchsbedingungen zeigte sich, dass Ethanol im Testansatz zu einer Erhöhung der ROS-Produktion führt.



3.1.8.3 Stimuliversuche mit der ROS-Produktion von Hämozyten

Abb. 91: Relative Summen der ROS-Produktionen von Mischhämolymphe in den ersten 4 h mit unterschiedlichen Stimuli im Testansatz (Angaben bis auf EtOH als Testansatzinhalte). Der mittlere prozentuale Vk beträgt 3,0% pro Testbedingung.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Stimuliwirkung wurden die Radikalproduktionssummen für die ersten 4 h ermittelt und prozentual auf die Negativkontrollen bezogen. Ethanol zeigte die stärkste stimulierende Wirkung auf die ROS-Produktion von Muschelhämozyten, gefolgt von der stimulierenden Wirkung der Latexpartikel. Die relativ niedrige phagozytoseassoziierte ROS-Produktion kann durch eine langsamere Antwortmöglichkeit der Zellen bedingt sein, da die Phagozytoseprozesse bei Anodontenhämozyten erst kontinuierlich einen erhöhten Radikalbedarf intrazellulär bewirken. Eine Aufnahme des Phenolrots kann ebenfalls nur langsam erfolgen, so dass die primär erfasste Antwort die extrazelluläre ROS-Produktion von Hämozyten war.



Abb. 92: Relativen Summen der ROS-Produktionen von Mischhämolymphe in den ersten 2 h mit unterschiedlichen Ethanol-Stimuli im Testansatz. Der mittlere prozentuale Vk beträgt 3,3% pro Testbedingung. Die Messungen erfolgten mit 4 Replikaten.

In Nachmessungen zeigte sich, dass Ethanol die bestimmbare ROS-Menge bis zu einer Testkonzentration von 10% konzentrationsabhängig steigert. Da Ethanol eine denaturierende Wirkung auf Membranproteine besitzt, kann die Membranpermeabilität der Hämozyten verändert worden sein. Ein zusätzlicher Nachweis intrazellulärer ROS konnte nicht ausgeschlossen werden.

3.1.8.4 Kinetik der ROS-Produktionen von Einzelhämolymphen ohne Stimulus aus der Rheinwasserhälterung

Um die individuellen Schwankungsbreiten des Messparameters zu untersuchen, wurden 10 Entenmuscheln aus der Rheinwasserhälterung punktiert und die ROS-Produktion von jeweils 50000 Hämozyten in 30 minütigen Intervallen mit der Phenolrotmethode untersucht.



Abb. 93: ROS-Produktionen von 10 unterschiedlichen Einzelhämolymphen in µmol H_2O_2 -Radikaläquivalente mit unterschiedlichen Hämozytenzahlen im Testansatz aus der Rheinwasserhälterung. Jede Einzelhämolymphe wurde als Dreifachansatz getestet, der mittlere prozentuale Vk beträgt 1,7%. Es wurde in 30-minütigen Intervallen über einen Zeitraum von 19 h gemessen.

Insgesamt 8 von 10 Hämolymphen zeigten vergleichbare ROS-Produktionskinetiken, die auch nach 6 h gut messbare Signalstärken um 1 μ mol H₂O₂-Radikaläquvalente/h ergaben. Zwei Einzelhämolymphen zeigten mehr als doppelt so hohe Radikalproduktionen in den ersten 6 h.

3.2 Effekte von Umweltchemikalien in vitro

3.2.1 Effekte von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von P388-Mausmakrophagen

Da die Phagozytoseleistung bezogen auf die Gesamtzellzahl, teilweise den Phagozytoseanteil als Messgröße integriert, wurden die Schwermetallwirkungen prozentual auf die Phagozytoseleistung der Negativkontrollen bezogen. Die folgende Abbildung zeigt Beispiele für die Unterschiedlichkeit der konzentrationsabhängigen Wirkungen von Schwermetallverbindungen. Die Konzentrationen sind als Probenkonzentrationen aufgetragen.



Abb. 94: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von P388-Mausmakrophagen. Die Messungen fanden mit drei Replikaten statt, der mittlere prozentuale Vk beträgt ca. 5%. Die Regression folgte mit einem 4-parametrischen logistischen Modell.

Die Schwermetallverbindungen zeigen sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bei logarithmischer Auftragung der Probenkonzentration. In niedrigen Konzentrationsberichen können Aktivivierungen der Phagozytoseleistung erfolgen, während um den EC₅₀-Wert drastische Hemmwirkungen auftreten. Über die Unterschiedlichkeit der Hemmwirkungen gibt ansatzweise eine Auflistung der EC₅₀-Werte für die getesteten Schwermetallverbindungen Auskunft. Die Daten wurden aus [105] entnommen.

Tab. 14: EC₅₀-Werte für Schwermetallverbindungen auf die Phagozytoseleistung (GE) von P388-Mausmakrophagen nach Regression mit einem 4-parametrischen logistischen Modell

Schwermetallverbindung	EC ₅₀ -Wert für die Probenkonzentration [mol/l]
CH₃HgCl	4,37 x 10 ⁻⁵
HgCl ₂	5,20 x 10 ⁻⁵
CdCl ₂	1,40 x 10 ⁻⁴
CuSO ₄	6,03 x 10 ⁻⁴
NiCl ₂	2,07 x 10 ⁻³

Die Hemmwirkungen können mehr als eine Zehnerpotenz in den EC_{50} -Werten auseinander liegen. Auch kann die Steigung um den EC_{50} -Wert sich deutlich voneinander unterscheiden (siehe Abb.94 für HgCl₂ und NiCl₂).

3.2.2 Effekte von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten

Auch bei der Verwendung von Muschelhämozyten zeigte sich die Phagozytoseleistung, bezogen auf die Gesamtzellzahl *in vitro*, als der sensitivere Messparameter gegenüber Schwermetallverbindungen mit einem größeren Auflösungbereich (siehe Kap. 3.2.2.1). Die folgende Abbildung zeigt Beispiele für die Unterschiedlichkeit der konzentrationsabhängigen Wirkungen von Schwermetallverbindungen. Die Konzentrationen sind als Probenkonzentrationen aufgetragen.



Abb. 95: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten. Die Messungen fanden mit 3 Replikaten statt, der mittlere prozentuale Vk beträgt ca. 8%. Die Regression erfolgte mit einem 4-parametrischen logistischen Modell.

Die Schwermetallverbindungen zeigen sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bei logarithmischer Auftragung der Probenkonzentration. Die folgende Tabelle zeigt die Unterschiedlichkeit der Hemmwirkungen anhand der EC₅₀-Werte, die mehrere Zehnerpotenzen auseinander liegen können.

Tab. 15: EC₅₀-Werte für Schwermetallverbindungen auf die Phagozytoseleistung (GE) von Muschelhämozyten nach Regression mit einem 4-parametrischen logistischen Modell

Schwermetallverbindung	EC50-Wert für die Probenkonzentration [mol/l]
CH₃HgCl	1,89 x 10⁻⁵
HgCl ₂	7,12 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄	5,87 x 10 ⁻⁴
CdCl ₂	1,95 x 10⁻³
NiCl ₂	1,15 x 10 ⁻²

Bei Methylquecksilberchlorid treten in niedrigen Konzentrationsbereichen Aktivierungseffekte auf, hingegen zeigten sich um den EC_{50} -Wert drastische Hemmwirkungen.Auf die Zeitabhängigkeit der Hemmwirkungen sollte in weiteren Untersuchungen eingegangen werden (siehe Kap. 3.2.3).

3.2.2.1 Effekte von Schwermetallen auf die Messparameter der Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten

Mischhämolymphe von Anodonten wurde 20 h mit Methylquecksilberchlorid inkubiert, anschließend wurden die Messparameter Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) bestimmt und prozentual gegen die Negativkontrollen aufgetragen.



Abb. 96 und 97: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Methylquecksilberchlorid auf die Phagozytosaktivität von Muschelhämozyten. Die Messungen fanden im Dreifachansatz statt, der mittlere prozentuale Vk beträgt 1,4% für den Phagozytoseanteil und 5,8% für die Phagozytoseleistung (GE). Die Regression erfolgte mit einem 4-parametrischen logistischen Modell. In diesem Fall zeigte sich die Phagozytoseleistung (GE) mit einem EC_{50} -Wert von 1,89 x 10⁻⁵ mol/l gegenüber dem EC_{50} -Wert des Phagozytoseanteils von 2,38 x 10⁻⁵ mol/l als der sensitivere Messparameter.

Phagozytoseanteil

Nur ein bestimmter Prozentsatz der Hämozyten kann Phagozytoseaktivität zeigen, was den Auflösungsbereich des Phagozytoseanteils nach oben limitiert. Da die Wirkung des Methylquecksilberchlorids in hohen Konzentrationen nicht zu einer sofortigen Phagozytosehemmung führt nimmt ein Teil der Hämozyten Latexpartikel auf und es kommt zu einer Begrenzung des Phagozytoseanteils von unten, ca. 40% der Hämozyten bezogen auf die Negativkontrollen waren phagozytoseaktiv. Durch die beidseitige Limitierung bleibt ein Auflösungsbereich von ca. 60%.

Phagozytoseleistung (GE)

Der Messparameter Phagozytoseleistung besitzt einen größeren Auflösungsbereich und kann im Gegensatz zum Phagozytoseanteil aktivierende Effekte über 100% des Negativkontrollniveaus anzeigen. Die Phagozytoseleistung der Muschelhämozyten konnte konzentrationsabhängig stimuliert und gehemmt werden. Durch die stimulierende Wirkung des Methylquecksilberchlorids in niedrigen Konzentrationen erhöht sich der Auflösungsbereich der Phagozytoseleistung nach oben. Durch die hohe Aufnahmeleistung der Hämozyten nach 20 h Expositionszeit unter unbelasteten Bedingungen werden Hemmeffekte des Methyquecksilberchlorids prozentual stark deutlich, die Phagozytoseleistung fällt bei hohen Konzentrationen unter 10% des Ausgangsniveaus. Insgesamt steht ein Auflösungsbereich von über 120% zur Verfügung, was den Messparameter favorisiert.

Die charakteristischen Punkte dieser Konzentrations-Wirkungsbeziehung für das Methylquecksilberchlorid lassen sich auch an den Dotplot- und Histogrammdarstellungen der Testansätze ableiten, aus denen die Berechnung der Messparameter analog zu den Säugetierzellen hervorgeht (siehe Kap. 3.1.1.2).

105

10⁵

10⁵

10⁵

105 10

Dotplot und Histogrammdarstellung der Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten unter Einfluss von Methylquecksilberchlorid



Abb. 98 bis 107: Dotplot und Histogrammdarstellung von Muschelhämozyten nach 20 h Inkubation mit Methylquecksilberchlorid. Die linken Abb. zeigen Positiv-und Negativereignisse zur Berechnung des Phagozytoseanteils. Die rechten Abb. zeigen die Fluoreszenzintensität der Ereignisse, woraus sich die Phagozytoseleistung errechnet. Die Konzentrationen nehmen von den oberen Abbildungsreihen zu. Die Darstellungen erfolgten mit FACSDiva.

Mit der Zunahme der Methylquecksilberchloridkonzentration fällt der Anteil der phagozytoseaktiven Hämozyten (siehe linke Abbildungsreihe), und die mittlere Fluoreszenzintensität der Hämozyten nimmt ebenfalls ab (rechte Abbildungsreihe). Durch die inhomogene Zusammensetzung der Hämolymphe kommt es zu einem fließenden Übergang im FSC von Trümmer-und Hämozytenbereichen, die Größenpopulationen der Hämozyten (siehe Kap. 3.1.3) können nicht unterschieden werden. Die vertikale Trennlinie im Dotplot wurde nach Vorversuchen mit Latexpartikellösungen als sichere Grenzlinie für Beadaggregationen identifiziert.

3.2.3 Regenerationsexperiment zur Wirkung von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten

In einem Folgeversuch wurde die Regeneration von der Hemmwirkung der Schwermetalle auf die Muschelhämozyten untersucht. Nach einer 20-stündigen Hemmwirkung bei der EC_{50} -Konzentration für verschiedene Schwermetalle erfolgten Waschschritte der Hämozyten mit Puffer und die verbleibende Hemmwirkung auf die Phagozytoseaktivität wurde 4, 8 und 24 h nach der Schwermetallexposition bestimmt.



Abb. 108: Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten. Die Messungen fanden im Dreifachansatz statt, der mittlere prozentuale Vk beträgt ca. 20%.

Zu den Zeitpunkten 4 h und 8 h nach dem Waschvorgang halten die Hemmwirkungen der Schwermetallverbindungen Nickeldichlorid, Methylquecksilber und Kupersulfat noch an und liegen unter 50% der Phagozytoseleistung der Negativkontrollen. Nach einer 24-stündigen Regenerationsphase zeigte sich, dass die Hemmwirkungen von Nickeldichlorid und Methylquecksilberchlorid sogar noch zunehmen; die absoluten Phagozytoseleistungen haben sich gegenüber dem 8 h-Niveau erneut halbiert. Die Hemmwirkung des Kupfersulfats kehrte sich zum Zeitpunkt 24 h sogar in eine deutliche Aktivierung der Phagozytoseleistung um, die auch über dem Niveau der Negativkontrollen liegt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die ermittelten *in vitro*- Hemmwirkungen (siehe Kap. 3.2.2) teilweise reversibel, teilweise aber auch irreversibel sind. In einem akuten Test, der die Modulation der Phagozytoseleistung nach 20 h Exposition der Hämozyten anzeigt, wird die Reversibilität der Wirkung nicht erfasst. Die Hemmwirkung des Nickeldichlorid auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten ist teilweise auch auf zytotoxische Effekte zurückzuführen (siehe Abb. 87 in Kap. 3.1.7).

3.2.4 *In vitro*-Effekte ausgewählter Umweltchemikalien auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten

Es wurde der Einfluss von ausgewählten Umweltchemikalien auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten *in vitro* bestimmt. Dazu wurden Vertreter der Pharmazeutika, der polychlorierten Biphenyle (PCB) und der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) getestet. Die PAK und PCB wurden aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit mit einem Löslichkeitsvermittler von 1% Ethanol über die Wasserlöslichkeitsgrenze hinaus eingesetzt und zeigten keine modulierenden Wirkungen auf die Phagozytoseleistung (GE).

Getestete Sub- stanzen	Probenkonzen	tration [mol/l]	Effekt	EC ₅₀ liegt zwischen [mol/l]
	Minimalkonz.	Maximalkonz.		
Pharmazeutika:				
17-α-	1,00 E-9	1,00 E-3	ja	1,00 E-4 und 1,00 E-3
Ethinylestradiol				
Amphotericin	5,00 E-7	1,00 E-4	nein	
Carbamazipine	1,00 E-7	1,00 E-4	nein	
Sulfamethoxazole	1,00 E-7	1,00 E-4	nein	
Tetrazyklin	5,00 E-7	1,00 E-4	ja	1,00 E-5 und 5,00 E-5
PCB:				
PCB 138	4,16 E-12	4,16 E-9	nein	
PCB 153	2,63 E-11	2,63 E-8	nein	
PAK:				
Acenaphten	1,25 E-8	1,25 E-5	nein	
Phenanthren	6,73 E-9	6,73 E-6	nein	

Tab. 16: Sensitivitätsspektrum der Phagozytoseleistung (GE) von Muschelhämozyten gegenüber ausgewählten Umweltchemikalien

Nur der Wirkstoff der Antibabypille, das 17-α-Etinylestradiol und das Antibiotikum Tetrazyklin zeigten überhaupt Effekte auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten. Doch traten die Wirkungen wie bei den Schwermetallverbindungen (siehe Kapitel 3.2.2) in Konzentrationsbereichen auf, die keine oder zumindest nur punktuelle Umweltrelevanz (z.B. im Bereich von Emissionen) besitzen (siehe Kap. 4.2.6). Die Sensitivität der erarbeiteten *In vitro*-Testverfahren für Phagozytoseaktivität ist demnach durch *In vivo*-Vergleichsversuche zu ergänzen, um eine Anwendbarkeit der Messparameter zu prüfen (siehe Kap. 3.3).

3.2.5 *In vitro-*Effekte von Schwermetallverbindungen auf die ROS-Produktion von Muschelhämozyten

Um den Einfluss von Umweltchemikalien *in vitro* auf die ROS-Produktion zu bestimmen, wurden unterschiedliche Schwermetallverbindungen in jeweils 8 Konzentrationen mit Mischhämolymphe getestet. Es zeigten sich bei fast allen Schwermetallen niedrigere Konzentrationsbereiche, in denen es zu signifikanten Stimulationen der ROS-Produktion kommt und höhere Konzentrationsbereiche, in denen die ROS-Produktion drastisch abnimmt.



Abb. 109: Schwermetalleinfluss auf die ROS-Produktion von Mischhämolymphe. Jede Bedingung wurde im Doppelansatz getestet, der mittlere prozentuale Vk beträgt ca. 5%. Es wurde in 30-minütigen Intervallen über einen Zeitraum von 9,5 h gemessen. Die Radikalproduktion der ersten 8h in µmol H₂O₂-Radikaläquivalente wurde summiert und in Relation zum Mittelwert von 5 Negativkontrollen gesetzt. Die Querlinien geben an, bei welcher Konzentration signifikante Aktivierungen und Reduzierungen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ≤ 5% eingesetzt haben.

Ein Kontrollversuch zur Peroxidase-Hemmung mit den getesteten Schwermetallkonzentrationen (nach EC 1.11.1.7) ergab, dass genügend Restaktivität bei allen Schwermetallkonzentrationen zur Verfügung steht, um Oxidationsprozesse zu katalysieren. Damit sind die hier gezeigten modulierenden Effekte der Radikalproduktion auf die Hämozyten zurückzuführen und nicht auf eine enzymatische Hemmung der Meerrettichperoxidase im Testansatz. Allerdings liegen auch bei diesem Messparameter die gezeigten modulierenden Konzentrationsbereiche weit über Belastungssituationen, wie sie heute in aquatischen Ökosystemen anzutreffen sind.

3.3 *In vivo*-Effekte ausgesuchter Schwermetalle auf die Phagozytoseleistung von Entenmuscheln

Es wurden die Schwermetallverbindungen mit der jeweils höchsten und niedrigsten *In vitro*-Hemmwirkung in Expositionsversuchen getestet (siehe Kap. 3.2.2). Bei beiden *In vitro*-Testverfahren zeigte sich Methylquecksilberchlorid mit der stärksten Hemmwirkung und Nickeldichlorid mit der schwächsten Hemmwirkung. Quecksilber und Nickel gehören zu den prioritären Stoffen nach Artikel 16 der Europäischen WRRL.

3.3.1 *In vivo*-Effekte des Methylquecksilberchlorids auf die Phagozytoseleistung von Entenmuscheln

Ausgehend von del *In vitro*- Nachweisgrenze für das Methylquecksilberchlorid, welche bei 4,25 mg/l lag, wurden Expositionsszenarien für jeweils 16 Muscheln bei einer Konzentration getestet. Es wurden Expositionskonzentrationen verwendet, die 1/100, 1/1000 und 1/10000 der *In vitro*-Nachweisgrenzkonzentration (LOEC) betragen, um Einblick auf längerfristige Wirkungen auf die Phagozytoseaktivität der Organismen zu erhalten. Zu den Expositionsintervallen 1,3,7 und 14 Tagen wurden je 4 Entenmuscheln punktiert und die gewonnenen Hämozyten auf ihre Phagozytoseleistung (GE) im Vierfachansatz getestet. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um den Einsatz an Versuchstieren nicht unnötig zu erhöhen, auch wenn die Gefahr einer statistischen Überinterpretation besteht (siehe Kap. 4.3.3).



Versuch mit Methylquecksilberchlorid bei einem 1/100 der In vitro-LOEC

Abb. 110: Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 42,5 μ g/l CH₃HgCl (1/100 der *In vitro*-LOEC). Aufgetragen wurden je 4 Replikate pro Versuchstier und mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle bei 0 d getestet (Irrtumswahrscheinlichkeiten: * $\leq 5\%$,** $\leq 1\%$,*** $\leq 0,1\%$).

Bei den kurzen Expositionsintervallen von 1 und 3 Tagen zeigten sich signifikante Aktivierungen der Phagozytoseleistung. Hingegen wurde bei den Expostionsintervallen 7 und 14 Tagen die Phagozytoseleistung zunehmend signifikant gehemmt. Alle Versuchstiere überlebten das Expositionsszenario, d.h. es handelt sich um subletale immunmodulierende Effekte.



Versuch mit Methylquecksilberchlorid bei einem 1/1000 der *In vitro*-LOEC

Abb. 111: Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 4,25 μ g/l CH₃HgCl (1/1000 der *In vitro*-LOEC). Aufgetragen wurden je 4 Replikate pro Versuchstier und mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle bei 0 d getestet (Irrtumswahrscheinlichkeiten: * $\leq 5\%$,** $\leq 1\%$,*** $\leq 0,1\%$).

Erst bei einem Expositionsintervall von 3 Tagen zeigten sich signifikante Aktivierungen der Phagozytoseleistung. Hingegen wurden bei den Expositionsintervallen 7 und 14 Tagen die Phagozytoseleistung signifikant gehemmt.





Abb. 112: Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 0,425 μ g/l CH₃HgCl (1/10000 der *In vitro*-LOEC). Aufgetragen wurden je 4 Replikate pro Versuchstier und mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle bei 0 d getestet (Irrtumswahrscheinlichkeiten: *< 5%,** < 1%,*** < 0,1%).

Erst bei einem Expositionsintervall von 14 Tagen zeigten sich signifikante Hemmungen der Phagozytoseleistung.

3.3.2 *In vivo*-Effekte von Nickeldichlorid auf die Phagozytoseleistung von Entenmuscheln

Ausgehend von der *In vitro*-Nachweisgrenze für das Nickeldichlorid, welches die schwächste Hemmwirkung *in vitro* zeigte und bei 614 mg/l lag, wurden Expositionsszenarien für jeweils 16 Muscheln bei einer Konzentration getestet. Die Messungen und Auswertungen erfolgten analog zu den Expositionsversuchen mit Methylquecksilberchlorid in Kapitel 3.3.1.

Im Expositionsintervall zwischen 7 und 14 Tagen verstarben die eingesetzten Versuchstiere (siehe Abb. 113), d.h. die eingesetzte NiCl₂–Konzentration kommt mit zunehmender Versuchdauer in den Bereich der letalen Wirkung. Nach 7 Tagen Expositionszeit wurden die Phagozytoseleistungen der Entenmuscheln signifikant reduziert. Das Antwortmuster, welches bei den Expositionsversuchen mit Methylquecksilberchlorid bei einem 1/100 und einem 1/1000 der *In vitro*-LOEC gezeigt wurde, ist hier auf die Inhibition der Phagozytoseleistung beschränkt und zeigte sich in zeitlich komprimierter Form. Bei einer Verringerung der Expositionskonzentration trat erneut das Antwortmuster der Stressaktivierung der Phagozytoseleistung der Phagozytoseleistung auf (siehe Abb. 114). Die Wirkung des NiCl₂ war in dieser Konzentration zu stark um subletale immunmodulierende Effekte über den gesamten Versuchszeitraum von 2 Wochen anzuzeigen.





Abb. 113: Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 6,14 mg/l NiCl₂ (1/100 der *In vitro*-LOEC). Aufgetragen wurden je 4 Replikate pro Versuchstier und mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle bei 0 d getestet (Irrtumswahrscheinlichkeiten: $* \le 5\%$, $** \le 1\%$, $*** \le 0,1\%$).



Versuch mit Nickeldichlorid bei einem 1/1000 der In vitro-LOEC

Abb. 114: Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 0,614 mg/l NiCl₂ (1/1000 der *In vitro*-LOEC). Aufgetragen wurden je 4 Replikate pro Versuchstier und mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle bei 0 d getestet (Irrtumswahrscheinlichkeiten: $* \le 5\%$, $* \le 1\%$, $** \le 0,1\%$).

Bei einem 1/1000 der *In vitro*-LOEC kam es erneut zu einer signifikanten Stressaktivierung nach einem Tag und zu signifikanten Hemmungen der Phagozytoseleistung an den folgenden Expositionsintervallen. NiCl₂ zeigt in dieser Konzentration zeitabhängige immunmodulierende Effekte in beide Antwortrichtungen.



Versuch mit Nickeldichlorid bei einem 1/10000 der In vitro-LOEC

Abb. 115: Phagozytoseleistungen im Expositionsversuch mit je 4 Entenmuscheln bei 61,4 µg/l NiCl₂ (1/10000 der *In vitro*-LOEC). Aufgetragen wurden je 4 Replikate pro Versuchstier und mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle bei 0 d getestet (Irrtumswahrscheinlichkeiten: * $\leq 5\%$,** $\leq 1\%$,*** $\leq 0,1\%$).

Bei einem 1/10000 der *In vitro*-LOEC traten nach 7 und 14 Tagen signifikante Aktivierungen der Phagozytoseleistungen der Versuchstiere auf. Die Konzentration war zu gering, um Hemmwirkungen der Phagozytoseleistung zu verursachen. Die Aktivierungen, die sich bei höheren Konzentrationen für das Nickeldichlorid und Methylquecksilberchlorid bei kurzen Expositionsintervallen gezeigt haben, sind bei dieser Konzentration auf die späteren Expositionsintervalle verschoben.

Schwermetallwirkungen auf die Phagozytoseleistung müssen konzentrations– und zeitabhängig in beide Antwortrichtungen verfolgt werden, um Aussagen über ein immunmodulierendes Potenzial geben zu können. Die Expositionszeit von 14 Tagen zeigte in den gewählten Expositionsszenarien das breiteste Antwortspektrum. Einmal wurden letale und 5 mal subletale immunmodulierende Effekte angezeigt, wovon 4 signifikante Hemmwirkungen und eine signifikante Aktivierung als Antwortrichtung auftraten. Dieses Expostionsintervall wurde deshalb auch bei Abwasserversuchen eingesetzt (siehe Kap. 3.4.2).

3.3.3 Verlauf der Phagozytoseleistung in vivo ohne Referenzsubstanz

Um ausschließen zu können, dass bei den Referenzsubstanzversuchen mit Methylquecksilberchlorid und Nickeldichlorid sich Messartefakte, die durch die Exposition der Entenmuscheln bedingt sind, niedergeschlagen haben, wurde das Expositionsszenario zweimalig mit je 16 Versuchstieren ohne Referenzsubstanz wiederholt.



Abb. 116: Phagozytoseleistungen von 2 unabhängigen Expositionsversuchen mit je 4 Entenmuscheln ohne Referenzsubstanz (insgesamt 40 getestete Muscheln). Aufgetragen wurden je 4 Mehrfachmessungen pro Versuchstier und mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle bei 0 d getestet (Irrtumswahrscheinlichkeiten: * $\leq 5\%$,** $\leq 1\%$,*** $\leq 0,1\%$).

Es wurden Entenmuscheln aus zwei unterschiedlichen Lieferungen der Fischköderzuchtteichanlage in der Nähe von Flensburg verwendet die, obwohl sie gleichsam für 3 Wochen im Labor vorgehältert wurden, recht hohe interindividuelle Schwankungen in der Phagozytoseleistung zeigten. Doch verschiebt sich der Median der Phagozytoseleistungen über die Expositionszeit von 2 Wochen nur geringfügig. Es können auch keine signifikanten Aktivierungen oder Hemmungen der Phagozytoseleistung beobachtet werden. Zu den Expositionsintervallen bei 7 und 14 Tagen zeigt sich eine größere Streuung der Phagozytoseleistungen als bei den kurzen Expositionsintervallen.

3.3.4 Bioakkumulationsergebnisse der Expositionsszenarien mit Methylquecksilberchlorid

Methylquecksilberchlorid wird bei allen 3 getesteten Expositionskonzentrationen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% linear über die Expositionszeit aufgenommen (siehe Abb. 117-119).



Abb. 117: Mittlere Quecksilberkonzentrationen und Bioakkumulationsfaktoren der Muschelgewebe aus dem Expositionsversuch mit 42,5 μ g/I CH₃HgCI. Es wurde der mittlere Quecksilbergehalt von je 4 Entenmuscheln aufgetragen und linear mit 95 %igen Konfidenzintervallen korreliert. Der prozentuale Vk der Quecksilberbestimmung liegt bei 1,1%.



Abb. 118: Mittlere Quecksilberkonzentrationen und Bioakkumulationsfaktoren der Muschelgewebe aus dem Expositionsversuch mit 4,25 μ g/I CH₃HgCI. Es wurde der mittlere Quecksilbergehalt von je 4 Entenmuscheln aufgetragen und linear mit 95 %igen Konfidenzintervallen korreliert. Der prozentuale Vk der Quecksilberbestimmung liegt bei 1,1%.



Abb. 119: Mittlere Quecksilberkonzentrationen und Bioakkumulationsfaktoren der Muschelgewebe aus dem Expositionsversuch mit 0,425 μ g/l CH₃HgCl. Es wurde der mittlere Quecksilbergehalt von je 4 Entenmuscheln aufgetragen und linear mit 95 % igen Konfidenzintervallen korreliert. Der prozentuale Vk der Quecksilberbestimmung liegt bei 1,1%.

Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass neben der linearen Korrelation über die Zeit, die Expositionskonzentration Einfluss auf die Bioakkumulation besitzt (siehe Abb. 120).



Abb. 120: Zusammenhang zwischen Expositionskonzentration und Bioakkumulation nach 14 Tagen Expositionszeit für Methylquecksilberchlorid.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass die Entenmuscheln zeit- und konzentrationsabhängig Methylquecksilber zunehmend stark akkumulieren.

3.3.5 Bioakkumulationsergebnisse der Expositionsszenarien mit Nickeldichlorid

Im Gegensatz zur Quecksilberaufnahme durch das Methylquecksilberchlorid verläuft die Nickelaufnahme nicht linear. Die Gewebekonzentrationen für Nickel steigen im Expositionsverlauf an und fallen anschließend wieder ab; auch werden im Vergleich zum Methylquecksilberchlorid wesentlich geringere Bioakkumulationsfaktoren erreicht (siehe Abb. 120 und Abb. 121).



Abb. 121: Mittlere Nickelkonzentrationen und Bioakkumulationsfaktoren der Muschelgewebe aus den Expositionsversuchen mit Nickeldichlorid. Es wurde der mittlere Nickelgehalt von je 4 Entenmuscheln aufgetragen. Der prozentuale Vk der Nickelbestimmung liegt bei 1,4%.

Die Ergebnisse lassen auf effiziente Ausscheidungsmechanismen für das Nickeldichlorid schließen, da bei der höchsten Expositionskonzentration kaum messbare Bioakkumulation nach 7 Tagen zu messen ist.





Es wurde das Expositionsintervall von 7 Tagen gewählt, da zum Zeitpunkt von 14 Tagen die Versuchstiere bei der höchsten Nickelkonzentration verstorben waren. NiCl₂ akkumuliert in der höchsten Konzentration nach 7 Tagen kaum, zeigt aber hoch signifikante Hemmwirkung auf die Phagozytoseleistung (siehe Abb. 111).

3.4 In vivo-Effekte von Abwasserproben

3.4.1 Abwasserversuche mit Testsystemen für allgemein toxische Effekte

Zwei Abwasserprobenpaare aus Zu- und Ablauf einer kommunalen und einer industriellen Kläranlage eines Metall verarbeitenden Industriebetriebes wurden für Versuche vom LANUV-NRW zur Verfügung gestellt (siehe Kap. 2.3.3.4). Das kommunale Abwasser wurde zusätzlich mit einer Konzentration von ca. 5,75 mg/l Carbamazipine dotiert, im Ablauf befanden sich noch ca. 3,45 mg/l. Da mit den Muscheltestungen vornehmlich immunmodulierende subletale Wirkungen bestimmt werden sollten, mussten Verdünnungsstufen dieser Abwasserproben getestet und identifiziert werden, in denen keine allgemeintoxischen Effekte zu erwarten waren. Ein gutes Instrument, um allgemeintoxische Wirkungen abzuschätzen, sind Biotestpaletten, in denen Vertreter der verschiedenen trophischen Ebenen die empfindlichste Reaktion in einer Verdünnungsstufe anzeigen können. Die limnische Biotestpalette der Bundesanstalt für Gewässerkunde wurde für diese Vorversuche eingesetzt und zeigte folgende Effekte für die Abwasserproben an.



Abb. 123: pT-Werte und niedrigste nichteffektive Verdünnungsstufen der limnischen Biotestpalette der Bundesanstalt für Gewässerkunde für die neutralisierten Abwasserproben. Die Verdünnungsstufen, die schwarz markiert wurden, kamen für die Muschelexpositionsversuche zum Einsatz.

Die kommunalen Abwasserproben zeigten nur im Zulauf Effekte bis zu einer Verdünnungstufe von 1 zu 2. In beiden industriellen Abwasserproben konnten toxische Effekte bis zu einer Verdünnungsstufe von 1 zu 16 gefunden werden. Die empfindlichsten Testorganismen für die industriellen Abwasserproben waren die Algen. Generell waren die toxischen Effekte im Zulauf stärker als im Ablauf. Ausgehend von den pT-Werten des sensitivsten Testorganismus wurden die Abwasserprobenpaare des kommunalen Abwassers, sowie des industriellen Abwassers, nochmals um den Faktor 2 für den Muschelexpositionsversuch mit deionisiertem Wasser verdünnt, neutralisiert und mit essentiellen Ionen aufgesalzen. Die kommunalen Abwasserproben wurden in einer Verdünnungstufe von 1 zu 8 und die industriellen Abwasserproben in einer Verdünnungstufe 1 zu 64 im Muschelexpositionsversuch eingesetzt.

3.4.2 *In vivo*-Abwasserversuche mit *Anodonta anatina* zur Erfassung immunmodulierender Effekte

Die 4 Abwasserproben sowie eine Positivkontrolle mit 1,1 mg/l Nickeldichlorid und die entsprechende Negativkontrolle wurden mit jeweils 6 Entenmuscheln über eine Expositionszeit von 2 Wochen mit täglichem Wasserwechsel getestet. 6 Messparameter wurden nach den Expositionen mit den Hämolymphen der exponierten Versuchstiere erfasst: nekrotischer Hämozytenanteil nach dem Phagozytoseansatz; vitale Hämozytendichte; ROS-Produktion in H₂O₂-Radikaläquivalenten in den ersten 90 min nach der Entnahme; Phagozytoseleistung (GE) der Gesamthämozyten; Phagozytoseanteil; Phagozytoseleistung (PE) der phagozytoseaktiven Hämozyten. Von 36 eingesetzten Muscheln überlebten 34. Es kam zu den beiden Ausfällen der Versuchstiere in den industriellen Abwasserprobenversuchen; von diesen Muscheln wurden keine Immunparameter bestimmt, wobei ein zusätzlicher Salinitätsstress durch diese Proben trotz der Verdünnungsstufe 1 zu 64 nicht auszuschließen war (siehe Tab. 7 in Kap. 2.3.3.4). Alle Ergebnisse dieser Versuche wurden wie in den *In vivo*-Referenzsubstanzversuchen (siehe Kap. 3.3.1 und 3.3.2) mit dem Mann-Whitney-U-Test gegenüber den Negativkontrollen verglichen und auf statistisch signifikante Abweichungen getestet. Die Ergebnisse sind aus den folgenden Abbildungen zu entnehmen.



Abb. 124: Phagozytoseleistungen der phagozytoseaktiven Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 9%, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 40%. Die Einzelwerte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle bei 14 d getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: * \leq 5%, ** \leq 1%, *** \leq 0,1%.



Abb. 125: Phagozytoseanteile der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 2%, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 10%. Die Einzelwerte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle bei 14 d getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: *< 5%, ** < 1%, ***< 0,1%.



Abb. 126: Phagozytoseleistungen der gesamten Hämozyten im Testansatz von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 11%, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 44%. Die Einzelwerte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle bei 14 d getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: * \leq 5%, ** \leq 1%, *** \leq 0,1%.



Abb. 127: ROS-Produktionen gemessen mit der Phenolrotmethode in den ersten 90 min in H_2O_2 -Radikaläquivalenten der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 5%, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 41%. Die Einzelwerte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle bei 14 d getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: *< 5%, ** < 1%, ***< 0,1%.



Abb. 128: Vitale Hämozytendichten nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer von Hämozyten aus Entenmuscheln direkt nach der Punktion nach zweiwöchiger Abwasserexposition. Es wurden je 6 Individuen getestet. Der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 33%. Die Einzelwerte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle bei 14 d getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: * \leq 5%,** \leq 1%, *** \leq 0,1%.



Abb. 129: Nekrotische Hämozytenanteile nach dem Phagozytoseansatz der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 9%, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 39%. Die Einzelwerte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle bei 14 d getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: *< 5%, ** < 1%, *** < 0,1%.

Die Positivkontrolle zeigte immunmodulierende Effekte bei allen funktionellen Messparametern an, womit die Funktionalität des Expositionsansatzes bewiesen wurde. Es konnten bei der vitalen Hämozytendichte und dem nekrotischen Zellanteil unter keiner der Versuchsbedingungen eine signifikante Abweichung beobachtet werden. Auch die hohe Überlebensquote von 34 von 36 eingesetzten Muscheln weist auf überwiegend subletale Wirkungen hin. Auffallend sind die hohen interindividuellen Schwankungen gegenüber den individuellen Messfehlern im Vierfachansatz. Sämtliche Ergebnisse werden in Kap. 4.3.2.2 zusammengefasst und abschließend bewertet. Die Zwischenergebnisse (Rangsummen, U-Werte, Signifikanzniveaus) der statistischen Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test befinden sich im Anhang in Kapitel 6.1.

3.4.3 Regeneration der Immunparameter nach dreiwöchiger Laborhälterung, im Anschluss an eine zweiwöchige Abwasser- und Referenzsubstanzexposition

Die Entenmuscheln aus den Versuchsbedingungen mit den stärksten immunmodulierenden Effekten (Zulauf ind. Abwasser und Positivkontrolle) wurden nach der Punktion für 3 Wochen in die Laborhälterung übernommen. Anschließend wurden die Messparameter der Abwasserexposition erneut bestimmt. Da unter unbelasteten Bedingungen die Entenmuscheln nach einem Punktionsintervall von 3 Wochen die Messparameter für vitale Hämozytendichte und Phagozytoseaktivität (siehe Kap. 3.1.4.4) vollständig regeneriert sind, wurde durch diesen Versuchsansatz die regenerative Fähigkeit der Muscheln nach Expositionsbedingungen getestet. Zusätzlich erlaubte dieser Versuchsansatz Erkenntnisse über die Dauer der Wirkungen aus dem Expositionsversuch. Eine Muschel ist in der Regenerationsphase nach der Exposition im Zulauf des industriellen Abwassers gestorben; der Tod konnte als Spätfolge der Exposition nicht ausgeschlossen werden. Aus den nachfolgenden Abbildungen sind die Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet. Die Zwischenergebnisse (Rangsummen, U-Werte, Signifikanzniveaus) der statistischen Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test sind im Anhang in Kapitel 6.2 zu finden.



Abb. 130: Phagozytoseleistungen der phagozytoseaktiven Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 9%, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 40%. Die Einzelwerte aus den Ansätzen nach der Regenerationsphase wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zu den Ansätzen nach der Exposition getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: *≤ 5%, ** ≤ 1%, ***≤ 0,1%.



Abb. 131: Phagozytoseanteile der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 3%, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 12%. Die Einzelwerte aus den Ansätzen nach der Regenerationsphase wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zu den Ansätzen nach der Exposition getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: * \leq 5%, ** \leq 1%, *** \leq 0,1%.



Abb. 132: Phagozytoseleistungen der bezogen auf die Gesamthämozyten von Entenmuscheln nach zwei-wöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 11 %, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 47%. Die Einzelwerte aus den Ansätzen nach der Regenerations-phase wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zu den Ansätzen nach der Exposition getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: *≤ 5%, ** ≤ 1%, ***≤ 0,1%.


Abb. 133: ROS-Produktionen gemessen mit der Phenolrotmethode in den ersten 90 min in H₂O₂-Radikaläquivalenten der Hämozyten von Entenmuscheln nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 7%, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 55%. Die Einzelwerte aus den Ansätzen nach der Regenerationsphase wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zu den Ansätzen nach der Exposition getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: *< 5%, ** < 1%, ***< 0,1%.



Abb. 134: Vitale Hämozytendichten nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer von Hämozyten aus Entenmuscheln direkt nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase. Es wurden je 6 Individuen getestet. Der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 36%. Die Einzelwerte aus den Ansätzen nach der Regenerationsphase wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zu den Ansätzen nach der Exposition getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: * \leq 5%, ** \leq 1%, *** \leq 0,1%.



Abb. 135: Nekrotische Hämozytenanteile nach dem Phagozytoseansatz von Hämozyten aus Entenmuscheln direkt nach zweiwöchiger Abwasserexposition und anschließender dreiwöchiger Regenerationsphase. Es wurden je 6 Individuen mit 4 Replikaten getestet. Der mittlere prozentuale individuelle Vk beträgt 11%, der mittlere prozentuale interindividuelle Vk beträgt 37%. Die Einzelwerte aus den Ansätzen nach der Regenerationsphase wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zu den Ansätzen nach der Exposition getestet. Irrtumswahrscheinlichkeiten: * \leq 5%, ** \leq 1%, *** \leq 0,1%.

Die vitale Hämozytendichte und der nekrotische Hämozytenanteil haben sich nach der Regeneration nicht signifikant verändert. Hingegen erhöhten sich alle Messparameter der Phagozytoseaktivität nach der dreiwöchigen Regenerationsphase signifikant und übertrafen auch die Phagozytoseaktivität der Negativkontrollen nach der Exposition. Die ROS-Produktion hat sich von einer Stimulation nach der Exposition auf das Niveau der der Negativkontrollen nach der Exposition gesenkt, was auf eine Regeneration des Messparameters deutet. Die Ergebnislage wird in Kapitel 4.3.2.4 ausführlich diskutiert.

3.5 Saisonalitäten in der Rheinwassermuschelhälterung

Im Jahresgang 2006 wurden mehrere abiotische und biotische Faktoren der Rheinwassermuschelhälterung erfasst, die auf den folgenden Abbildungen dargestellt sind.

3.5.1 Abiotische Faktoren der Rheinwasserhälterung

Für spätere statistische Betrachtungen wurde der Temperaturverlauf in eine Anstiegsphase (KW 13-27), eine Extremphase (KW 29-41) und eine Abklingphase (KW 43-51) unterteilt.



Abb. 136: Temperaturverlauf der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung (n=52).



Abb. 137: Leitfähigkeitsverlauf der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung (n=52). Die Leitfähigkeit wurde vor der Entnahme der Muscheln bestimmt.



Abb. 138: Sauerstoffgehalt und pH-Werte der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung (n=52). Die Messungen erfolgten vor der Entnahme der Muscheln.

Die abiotischen Faktoren der Rheinwasserhälterung im Jahresgang 2006 zeigen charakteristische Verläufe, wie sie auch für andere Jahresgänge und fließende Gewässer typisch sind. Die Temperaturen steigen im Frühling und in den frühen Sommermonaten an, erreichen ein Maximum im Sommer und klingen dann im Spätsommer, Herbst und Winter wieder ab. Die Leitfähigkeiten zeigen in den Wintermonaten höhere Werte als in den Sommermonaten, was z.B. durch den Einsatz von Streusalzen zu erklären ist. Ebenfalls bilden Verdünnungen durch Regenfälle und Abflussmengen saisonale Einflussgrößen. Der pH-Wert schwankt nur geringfügig im Jahresverlauf um den Wert 8. Der O₂ -Gehalt ist in den Wintermonaten durch die niedrigeren Temperaturen höher, da die Löslichkeit für Gase in diesem Zeitraum ebenfalls gesteigert ist. Um die Kalenderwoche 30 fällt der O₂ -Gehalt auf Werte um 6 mg/l, was für die Muschelhälterung nicht bedenklich ist. Die erfassten abiotischen Messparameter verhalten sich innerhalb der natürlichen Schwankungsbreiten (Vergleich mit Aufzeichnungen der BfG).



3.5.2 Biotische Faktoren der Rheinwassermuschelhälterung





Abb. 140: Mittlerer Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) von Hämozyten der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung. Die Mittelwerte wurden aus Messungen zu 29 Untersuchungszeitpunkten im Mittel mit 6 Individuen pro Zeitpunkt bestimmt (n=174). Der interindividuelle prozentuale Vk beträgt 14% beim Phagozytoseanteil und 50% bei der Phagozytoseleistung. Der mittlere prozentualeVk einer Dreifachmessung der Phagozytoseleistung beträgt 13% pro Individuum.



Abb. 141: Mittlere vitale Hämozytenzahlen nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer von Hämozyten der Entenmuschel-Rheinwasserhälterung. Die Mittelwerte wurden zu 29 Untersuchungszeitpunkten im Mittel mit 6 Individuen pro Zeitpunkt bestimmt (n=174). Der interindividuelle Vk beträgt 39%.

Der Chlorophyllgehalt im Jahresgang 2006 zeigte mehrere Algenblüten im Jahresverlauf an, dennoch wird ein unteres Level von 5 µg/l selten unterschritten, so dass für die Muschelhälterung keine dauerhafte Unterversorgung erfolgte. Der Zulauf beträgt 840 l/h und es wurden nicht mehr als 100 Teichmuscheln parallel im Rheinwasser gehältert. Daraus folgt, dass für jede Muschel theoretisch mindestens 1,008 mg/d an Chlorophyll zur Verfügung standen. Auch konnten keine Gewichtsabnahmen der Muscheln nach Hälterungsintervallen von mehr als 3 Monaten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Messparameter für die Phagozytoseaktivität (Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE)) weisen, neben den hohen interindivuellen Schwankungen, für die Stichprobenzahl von 6 Individuen, saisonale Rhythmen auf. Es kommt zu zahlreichen lokalen Anstiegsund Abklingphasen, die größtenteils parallel verlaufen (siehe Abb. 127). Durch den parallelen Verlauf von Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) konnte die Phagozytoseleistung als Maß für die Phagozytoseaktivität eingesetzt werden; zudem integriert sie rechnerisch den Phagozytoseanteil. Auch zeigen die vitalen Hämozytendichten neben den beträchtlichen relativen interindividuellen Schwankungen von 39% bei 6 Individuen pro Messzeitpunkt, eine saisonale Rhythmik, die in weiteren Korrelationsanalysen untersucht wurde. Die Saisonalität dieser Schwankungen wird im Kapitel 3.5.3 durch Korrelationsanalysen gestützt.

3.5.3 Korrelationsananalysen der Messparameter Temperatur, Phagozytosleistung und vitaler Hämozytenzahl für die Zeitintervalle KW 13-27; 29-41 und 43-51

Die Korrelationsintervalle wurden nach dem saisonalen Temperaturverlauf gelegt. KW 13-27 entspricht der Anstiegsphase, KW 29-41 der Extremphase und KW 43-51 der Abklingphase. Es wurden jeweils die Mittelwerte der Messparameter Phagozytoseleitung, vitale Hämozytendichte und die Temperatur zum Zeitpunkt der Muschelentnahme gegenübergestellt und auf formale Korrelation nach [115] (siehe Kap. 6.2) getestet.

Korrelationen für die Anstiegsphase



Abb. 142: Korrelation zwischen Wasserhälterungstemperatur und mittlerer Phagozytoseleistung (aus n = 49) für die KW 13-27 mit 95 %igen Konfidenzintervallen. Im untersuchten Zeitintervall gibt es eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,791. Eine Korrelation kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von \leq 1% angenommen werden.

Abb. 143: Korrelation zwischen Wasserhälterungstemperatur und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus n = 49) nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer für die KW 13-27 mit 95 %igen Konfidenzintervallen. Im untersuchten Zeitintervall gibt es eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,820. Eine Korrelation kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von \leq 1% angenommen werden



Abb. 144: Korrelation zwischen mittlerer Phagozytoseleistung (aus n=49) und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus n=49) nach Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer für die KW 13-27 mit 95 %igen Konfidenzintervallen. Im untersuchten Zeitintervall gibt es eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,665. Eine Korrelation kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von ≤ 5% angenommen werden.



Korrelationen für die Extremphase

on. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,154.

Abb. 145: Korrelation zwischen Wasserhälte- Abb. 146: Korrelation zwischen Wasserhälterungsrungstemperatur und mittlerer Phagozytoselei- temperatur und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus stung (aus n = 48) für die KW 29-41 mit 95 n = 48) nach Trypanblaufärbung und Zählung in der %igen Konfidenzintervallen. Im untersuchten Neubauerkammer für die KW 29-41 mit 95 %igen Zeitintervall gibt es keine signifikante Korrelati- Konfidenzintervallen. Im untersuchten Zeitintervall gibt es keine signifikante Korrelation. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,345.



Phagozytoseleistung(GE) in Beads/Hämozyt

Abb. 147: Korrelation zwischen mittlerer Phagozytoseleistung (aus n = 48) und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus n = 48) nachTrypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer für die KW 29-41 mit 95 %igen Konfidenzintervallen. Im untersuchten Zeitintervall gibt es keine signifikante Korrelation, der Korrelationskoeffizient beträgt 0,246.



Korrelationen für die Abklingphase

on. Der Korre-lationskoeffizient beträgt 0,348.

Abb. 148: Korrelation zwischen Wasserhälte- Abb. 149: Korrelation zwischen Wasserhälterungsrungstemperatur und mittlerer Phagozytoselei- temperatur und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus stung (aus n = 55) für die KW 43-51 mit 95 n = 55) nach Trypanblaufärbung und Zählung in der %igen Konfidenzintervallen. Im untersuchten Neubauerkammer für die KW 43-51 mit 95 %igen Zeitintervall gibt es keine signifikante Korrelati- Konfidenzintervallen. Im untersuchten Zeitintervall gibt es eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,826. Eine Korrelation kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von ≤ 1% angenommen werden



Abb. 150: Korrelation zwischen mittlerer Phagozytoseleistung (aus n=55)und mittlerer vitaler Hämozytenzahl (aus n=55) nachTrypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer für die KW 43-51 mit 95 %igen Konfidenzintervallen. Im untersuchten Zeitintervall gibt es keine signifikante Korrelation, der Korrelationskoeffizient beträgt 0,371.

Eine zusammenfassende Darstellung und Diskussion der Korrelationsanalysen findet in Kapitel 4.4.2 statt. Im folgenden Kapitel wird auf die Unterschiede der Immunparameter der vitalen Hämozytendichte und der Phagozytoseleistung in der Rheinwasser- und der Laborhälterung eingegangen.

3.5.4 Vergleich zwischen den Messparametern Phagozytoseleistung und vitaler Hämozytendichte in Labor- und Rheinwasserhälterung

Die Messparameter der Phagozytoseleistung (GE) und des Phagozytoseanteils zeigen in der Rheinwasserhälterung parallele Verläufe (siehe Abb. 140 in Kap. 3.5.2) und beide Messparameter besitzen eine enge Korrelation bei verschiedenen Hälterungstemperaturen der Entenmuscheln (siehe Abb. 85 in Kap. 3.1.6.5). Demnach kann die Phagozytoseaktivität durch den Immunparameter der Phagozytoseleistung angezeigt werden. Im Vergleich wurden 21 Mittelwerte aus Phagozytoseleistungsmessungen der Laborhälterung den Messungen der Rheinwasserhälterung gegenübergestellt und mit dem Mann-Witney-U-Test auf signifikante Unterschiede getestet.



Abb. 151: Mittlere Phagozytoseleistungen der Phagozytosemessungen aus der Laborhälterung gegenüber der Rheinwasserhälterung im Jahresverlauf 2006. Der Mittelwert der Phagozytoseleistung der Laborhälterung beträgt 9,37 Beads/Hämozyt mit einem prozentualen Vk von 22%. Der Mittelwert der Phagozytoseleistung der Rheinwasserhälterung beträgt 8,76 Beads/Hämozyt mit einem prozentualen Vk von 50%. Die mittleren prozentualen individuellen Vk der Phagozytoseleistung betragen 10 % für die Laborhälterung und 13% für die Rheinwasserhälterung. Mit dem Mann-Whitney-U-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Phagozytoseleistung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit ≤ 5% gefunden werden, eine signifikante Varianzungleicheit konnte mit dem Levene-Test bestimmt werden.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Phagozytoseleistungsniveau gefunden werden, die mittleren Phagozytoseleistungen liegen zwischen 8,5 und 9,5 Beads pro Hämozyt unter beiden Hälterungsbedingungen. Auffallend ist eine Varianzungleichheit zwischen den Hälterungsbedingungen, der mittlere prozentuale Vk der Phagozytoseleistungen aus der Rheinwasserhälterung liegt bei 50%, hingegen liegt er in der Laborhälterung bei 22%. Auf den Einfluss der Temperatur und temperaturabhängigen Bedingungen in der Rheinwasserhälterung wurde in Kap. 4.4.2 eingegangen, so dass die höheren Schwankungen teilweise erklärbar sind. Die methodischen Fehler der Dreifachbestimmung liegen zwischen 10 und 13% und nehmen einen vergleichsweise geringen Anteil an den gezeigten Schwankungen ein. Ein Vergleich der mittleren vitalen Hämozytendichten zwischen beiden Hälterungsbedingungen zeigte, dass auch das Niveau der mittleren vitalen Hämozytendichten in Rheinwasserund Laborhälterung ähnlich ist, aber gleichsam enormen Schwankungsbreiten unterliegt.



Abb. 152: Mittlere vitale Hämozytendichten nach Trypanblaufärbung und Neubauerzählung aus der Laborhälterung gegenüber der Rheinwasserhälterung im Jahresverlauf 2006. Der Mittelwert der vitalen Hämozytendichte der Laborhälterung beträgt 4,60 x 10^5 Hämozyten/ml mit einem prozentual Vk von 48%. Der Mittelwert der vitalen Hämozytendichte der Rheinwasserhälterung beträgt 5,01 x 10^5 Hämozyten/ml mit einem prozentualen Vk von 50%. Mit dem Mann-Whitney-U-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der mittleren vitalen Hämozytendichten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$ gefunden werden.

Die enormen Schwankungsbreiten in der vitalen Hämozytendichte unter verschiedenen Hälterungsbedingungen stellen diesen Immunparameter gegenüber den funktionellen Immunparametern gänzlich in Frage. Neben den saisonalen Abhängigkeiten in der Rheinwasserhälterungen können Mehrfachpunktionen Einfluss auf die vitalen Hämozytendichten der Hämolymphe gehabt haben (siehe Kap. 4.4.4).

4 Diskussion

Sowohl der Material- und Methodenteil als auch die Ergebnisteile können den untersuchten Erfassungsbenen zugeordnet werden (siehe Abb. 153). Diese Ebenen werden zunächst einzeln und anschließend vergleichend diskutiert.



Abb. 153: Verwendete Erfassungsebenen der Immunparameter

4.1 In vitro-Versuche mit Säugerimmunzellen

Es konnten verschiedene durchflusszytometrische Messparameter zur Erfassung der Phagozytoseaktivität an HL 60-Zellen erarbeitet werden. Diese umfassten den Phagozytoseanteil und zwei Phagozytoseleistungsparameter, bezogen auf die phagozytoseaktiven Zellen und die Gesamtzellzahl (siehe Kap. 3.1.1.2). Die Kinetiken dieser Messparameter wurden untersucht, und eine enge Korrelation zwischen Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) konnte im Versuchszeitraum zwischen 0,5 bis 6 h gefunden werden. Die phagozytoseaktiven HL 60-Zellen eigneten sich, um die verschiedenen Messparameter für die Phagozytoseaktivität zu erarbeiten.

Die Phagozytoseaktivität reduziert sich jedoch stark bei einer Unterschreitung der Versuchstemperatur von 37 °C (siehe Abb. 43 in Kap. 3.1.1.4). Vitalitätsmessungen nach Propidiumjodidfärbungen der HL 60-Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen ermöglichen eine sehr gute Identifizierung nekrotischer Zellanteile (siehe Kap. 3.1.1.1). Obwohl die Differenzierung von HL 60-Zellen in mehreren Publikationen [119] [105] beschrieben wird, konnte jedoch kein chemischer Stimulus identifiziert werden, der eine gleichbleibende Phagozytoseaktivität und gute Wachstumseigenschaften der Zelllinie vereinte. In der Auseinandersetzung mit der Differenzierungsproblematik der HL 60-Zellen in gleichbleibend phagozytosaktive Formen konnte herausgefunden werden, dass durch die leichte Induzierbarkeit von Differenzierungsvorgängen durch zahlreiche Stimuli (siehe Kap. 2.2.6) die Gefahr ungewollter spontaner Differenzierung mit zunehmender Passagenanzahl steigt [121]. Der Differenzierungsstand der Zellkultur sollte daher ständig überwacht werden und steht Standardisierungsbestrebungen entgegen. Das führte zu dem Entschluss, phagozytoseaktive HL 60-Zellen nicht als Testverfahren zur Messung von *In vitro*-Effekten auf die Phagozytoseaktivität von Säugerimmunzellen einzusetzen.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen einer parallel durchgeführten Diplomarbeit [105] eine Übertragarkeit der Messparameter auf bereits ausdifferenzierte phagozytoseaktive P388-Mausmakrophagen getestet. Das durchflusszytometrische Mess- und Testprinzip ließ sich auf P388-Mausmakrophagen, mit anderen Phagozytose- und Wachstumseigenschaften, nach einer methodischen Anpassung (siehe Tab. 13 in Kap. 3.1.6.8) übertragen. Es konnten die Rahmenbedingungen zur Messung der Phagozytoseaktivität an den P388-Zellen erabeitet und auch Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für Schwermetallverbindungen auf die Phagozytoseaktivität beschrieben werden (siehe Kap. 3.2.1), in denen konzentrationsabhängig stimulierende als auch hemmende Effekt angezeigt werden.

Auf Fragen der Sensitivität der Säugetierzellen wird in Kap. 4.5.1 eingegangen. Eine Übertragung der verwendeten Mess-und Testprinzipien (siehe Kap. 2.1) ist prinzipiell auf alle phagozytoseaktive Zellen möglich und erfolgte auf Muschelhämozyten von *Anodonta anatina*.

4.2 In vitro-Versuche mit Muschelhämozyten

Zusammenfassung

Verschiedene Methoden zur Gewinnung der Muschelhämozyten wurden getestet. Anfängliche Versuche, die Muschelhämozyten in Primärkultur zu nehmen, führten aufgrund hoher Verluste an Vitalität und Leistungsfähigkeit der Hämozyten zu dem Entschluss, die Hämozyten aus Mehrfachpunktionen der Entenmuscheln zu generieren. Dabei wurden minimale Punktionsintervalle berücksichtigt, nach denen die vitale Hämozytendichte und die Phagozytoseaktivität regeneriert waren und erlaubten, je nach Größe der Organismen und Hälterungsbedingungen, zwischen 3 und 5 Punktionen pro Versuchstier.

Charakteristika der Hämozyten wie Adhäsionsverhalten, Temperatureinflüsse durch Versuchs- und Hälterungstemperatur auf die Phagozytoseaktivität und die dazugehörigen Kinetiken der Messparameter wurden untersucht. Auch konnte eine weitere Methode zur Messung von extrazellulärer ROS-Produktion von Muschelhämozyten etabliert und untersucht werden. Sowohl die Hälterungs- als auch die Versuchstemperatur bewirkten bis zu einem maximalen Antwortbereich eine Steigerung der Phagozytoseaktivität. Im chemisch unbelasteten Zustand korrelierten die Messparameter für Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) bis zu einem Zeitintervall von mindestens 6 h Phagozytoseaktivität.

Aufgrund der erarbeiteten Versuchsbedingungen konnten In vitro-Hemmversuche mit Xenobiotika auf die Phagozytoseaktivität durchführt werden. Mehrere Schwermetallverbindungen, 5 Pharamzeutika, 2 PCBs und 2 PAKs, für die in der Literatur immunmodulierende Effekte an Muscheln beschrieben wurden, konnten in weiten Konzentrationsbereichen auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Für Schwermetallverbindungen zeigten sich sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen, die mehrere Größenordnungen in ihrer Hemmwirkung auseinanderliegen können. In niedrigen Konzentrationen kann eine Effektumkehr (Aktivierung) erfolgen, die auch für Hämozyten anderer Muschelarten beschrieben wurde. Die Empfindlichkeit der Phagozytoseaktivität der Muschelhämozyten von Entenmuscheln für Schwermetalle ist vergleichbar mit anderen marinen und limnischen Muschelarten. Allerdings finden die akuten Wirkungen auf die Phagozytoseaktivität in Konzentrationen statt, die aktuelle Belastungssituationen in Oberflächegenwässern in der Regel nicht anzeigen können. Von den anderen getesteten Xenobiotika zeigten nur das Antibiotikum Tetrazyklin und ein Wirkstoff von Kontrazeptiva, das 17- α -Ethinylestradiol, Effekte auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten. Diese Effekte lagen aber gleichsam mehr als drei Größenordnungen von Umweltkonzentrationen entfernt. Ähnlich unempfindlich reagierte der Messparameter für ROS-Produktion mit Muschelhämozyten von Entenmuscheln im In vitro-Ansatz. Daher wurde die Empfindllichkeit der erabeiten In vitro-Mehoden für Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion mit In vivo-Folgeversuchen in Relation gesetzt.

4.2.1 Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten

Auch für Muschelhämozyten konnten die Messparameter für Phagozytoseaktivität übertragen werden, doch mussten zuvor mehrere methodische Einflussgrößen auf die Phagozytoseaktivität identifiziert und bewertet werden. Diese umfassten:

- Adhäsions-und Aggregationsverhaltens (Kap. 3.1.5)
- Hämozytenzahl im Testansatz (Kap. 3.1.6.1)
- Serumanteil und der Latexpartikelzahl im Testansatz (Kap. 3.1.6.3)
- Testansatzvorbehandlungen, wie Trypsinisierung (Kap. 3.1.6.4)
- Versuchtemperatur und Schüttelbedingungen (Kap.3.1.6.5 und 3.1.6.8)
- Ermittlung der Phagozytosekinetiken (Kap. 3.1.6.6)
- Hälterungsbedingungen der Muscheln (Kap. 3.1.6.7)
- Regenerationsfähigkeit der Hämolymphfunktionen nach der Punktion von Muscheln (Kap. 3.1.4.4)

Aus den Ergebnissen dieser Versuche konnten optimale Versuchsbedingungen für alle weiteren Phagozytoseaktivitätsmessungen abgeleitet werden.

4.2.2 Gewinnung der Hämozyten

Primärkulturversuche

Anfängliche Versuche, Hämozyten in eine Primärkultur zu nehmen zeigten (siehe Kap. 3.1.4.3), dass die vitale Hämozytendichte 3 Tage nach der Entnahme auf 35% zum Ausgangsniveau und nach 6 d auf 15% abnimmt. Die Phagozytoseaktivität fällt auf unter 20% nach 6 d Standzeit. Zytotoxische Effekte nach der Entnahme verringern Vitalität und Leistungsfähigkeit der Hämozyten. Die ROS-Produktion der Hämozyten ist direkt nach der Entnahme maximal (siehe Abb. 89 In Kap. 3.1.8.2 und Abb. 93 in Kap. 3.1.8.4) und signalisiert einen möglichen "Alarmzustand" der Hämozyten, der zu Zytotoxizität geführt haben kann. Auch können Unterversorgungen der Hämozyten einen Teil dieser Vitalitätsabnahme erklären, da keine zusätzlichen Nährstoffe durch Mediumzugaben zur Verfügung standen. Die Vitalität von Hämozyten 24 h nach der Entnahme unterliegt artspezifisch großen Schwankungen [78], was möglicherweise auf unterschiedliche Verteidigungsstrategien der Hämozyten zurückzuführen ist. Da einige Aspekte zu den Hämozyten von Muscheln noch unklar sind, z.B. ob die Hämozyten generell teilungsfähig sind oder aus einem hämatopoetischen Gewebe kontinuierlich nachgebildet [25] werden und es verschiedene Differenzierungsmodelle für Hämozyten in Bivalvia gibt [27] [25], wurde der Ansatz eine Primärkultur zu etablieren nicht weiter verfolgt. In einer Primärkultur hätten teilungsfähige Hämozytenpopulationen wie neoplastische Hämozyten einen Selektionsvorteil, aber es wäre weiterhin unklar, ob diese Zellen auch ein naturnahes Abbild der Hämolymphfunktionen geben könnten. Besonders für den verwendeten limnischen Testorganismus *Anodonta anatina* existiert noch zu wenig Wissen über die einzelnen Hämozytenpopulationen und deren spezifische Funktionen. Eine Generierung der Hämozyten kann auch durch mehrfache Punktion der Muscheln erfolgen.

Punktionen von Entenmuscheln

Im Methodenaufbau wurden häufig Punktionen an Muscheln zur Hämolymphgenerierung durchgeführt. Obwohl diese Technik der Hämolymphentnahme für andere Süßwassermuscheln (Elliptio complanata) als nicht letale und minimal invasive Methode bewertet wurde [122], kam es zu erheblichen Degenerationserscheinungen am vorderen Schließmuskelgewebe der Entenmuscheln (siehe Kap. 3.1.4.1). Diese Degenerationserscheinungen waren in der Rheinwasserhälterung der Entenmuscheln wesentlich ausgeprägter (siehe Kap. 4.4.4) als in der Laborhälterung. In der Laborhälterung der Muscheln konnten Bedingungen definiert werden (Hälterung in limnischem Rekonstitutionswasser, Fütterung der Versuchstiere mit Desmodesmus subspicatus, wöchentliche Wasserwechsel bei gleichbleibender Temperatur, näheres in Kap. 2.3.3), die mehrmonatige Hälterungen von Muscheln gewährleisten können und auch besser vergleichbare Phagozytoseaktivitäten als in der Rheinwasserhälterung bewirkten (siehe Kap. 3.5.4). Unter Berücksichtigung der Regenerationsintervalle von 3 Wochen, nach denen die vitale Hämozytendichte und Phagozytoseaktivität der Hämozyten in Entenmuscheln regeneriert sind (siehe Kap. 3.1.4.4), sind so zwischen 3 und 5 Punktionen je nach Größe der Testorganismen möglich, die eine kontinuierliche Generierung von Hämozyten erlauben.

4.2.3 Adhäsionsverhalten der Hämozyten

Das Adhäsions- und Aggregationsverhalten von Muschelhämozyten direkt nach der Entnahme ist für mehrere Muschelarten [23] [52] beschrieben. Dabei handelt es sich um spontane Ereignisse [53], was auch an den Hämozyten von Entenmuscheln beobachtet werden konnte. Direkt nach der Entnahme ist das Adhäsions- und Aggregationsverhalten der Hämozyten von Teichmuscheln in Einzel- und in Mischhämolymphe besonders stark ausgeprägt und auch materialabhängig (siehe Kapitel 3.1.5). Erst 6 h nach der Entnahme werden die messbaren Ausgangshämozytendichten zum Zeitpunkt der Entnahme erreicht. Nach 24 h findet man sogar noch höhere Hämozytendichten, als zum Zeitpunkt nach der Entnahme; was darauf schließen lässt, dass ein Teil der Hämozyten schon während der Punktion und vor der Zählung durch Aggregations- und Adhäsionsverhalten nicht erfasst werden kann. Es handelt sich bei der Adhäsion der Anodontenhämozyten um einen relativ schnellen Prozess.

Diese Ergebnisse sind von messtechnischer Relevanz, da erst nach längeren Versuchszeiten, z.B. nach 20 h wesentlich mehr Hämozyten aus dem Testansatz durchflusszytometrisch erfasst werden (siehe Abb. 75 in Kap. 3.1.6.4) und eine sicherere statistische Basis bieten. Auch können ungleichmäßige Anstiege von Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung durch das Adhäsions- und Aggregationsverhalten der Hämozyten bedingt sein. Unspezifisch angelagerte Latexpartikel erzeugen in den kurzen Messintervallen falsch positive Ereignisse im Phagozytoseanteil, hingegen wird der Messparameter Phagozytoseleistung schwächer beeinflusst (siehe Abb. 75 und 76 in Kap. 3.1.6.4). Deshalb wurden bei weiteren Untersuchungen die Hämozyten vor der Messung für 1 min trypsiniert und dabei 3 x für 5 s bei 2500 U/min geschüttelt, um den Anteil unspezifisch angelagerter Partikel bei der Messung zu minimieren. Die Versuchsparameter zeigten nach der Veränderung der Testansatzvorbehandlung gleichmäßigere Anstiege in Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung in den kürzeren Messintervallen (siehe Kap. 3.1.6.6) sowie eine bessere Korrelation. Auch führte die Trypsinisierung zu einer Erhöhung der Ereignisausbeute. In anderen Publikationen mit durchflusszytometrischen Untersuchungen der Phagozytoseaktivität, z.B. [49] [51] wird teilweise dieses Adhäsionsproblem bei der Bestimmung eines Phagozytoseindex umgangen. Der Phagozytoseindex berücksichtigt nur Hämozyten, die 3 oder mehr Latexpartikel aufgenommen haben. Anlagerungen von ein oder zwei Latexpartikeln werden damit nicht berücksichtigt.

Die Verwendung von Mischhämolymphe führt in Folge einer Interimmunreaktion zu verstärktem Aggregationsverhalten der Hämozyten. Das Adhäsionsverhalten ist mit dem von Einzelhämolymphe vergleichbar (siehe Abb. 71 in Kap. 3.16.5). Eine Verwendung von Mischhämolymphe, die aus mehreren Individuen gewonnen wurde, ist eine gängige Methode, um interindividuelle Schwankungen bei Bestimmungen von Wirkungen auf die Phagozytoseaktivität von Hämozyten zu minimieren [82] [35] und kam bei den *In vitro*-Versuchen für Xenobiotika zum Einsatz. Das Adhäsionsverhalten von Hämozyten wird in anderen Studien sogar als eigenständiger Immunparameter für eine Bewertung von immuntoxischen Potienzialen diskutiert [53] [55]. Da die Phagozytose die Adhäsion von Fremdpartikeln involviert, wurde auf eine separate Betrachtung der Adhäsionsfähigkeit als Immunparameter in dieser Arbeit verzichtet.

4.2.4 Temperatureinfluss auf die Phagozytoseaktivität

Temperatureinflüsse können die Phagozytoseantwort in Muscheln direkt [47] [49] oder auch indirekt durch Veränderung der Sensitivität für Xenobiotika [76] modulieren. Die Temperatur beeinflusst die Phagozytoseaktivität von Hämozyten auf mehrere Weisen: Einerseits beeinflusst die Versuchstemperatur direkt die Phagozytoseaktivität der Hämozyten (siehe Kap. 3.1.6.7); da es sich auch um einen aktiven Transportprozess handelt. Andererseits nimmt die Hälterungstemperatur der Entenmuscheln bei der Verwendung einer konstanten Versuchtemperatur Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Hämozyten (siehe Kap. 3.1.6.5), was auf Anpassungsvorgänge der Muscheln schließen lässt.

Einfluss der Versuchstemperatur

In einem Temperaturbereich von 4 bis 25 °C lässt sich eine Steigerung der Phagozytoseaktivität mit der Versuchtemperatur feststellen (siehe Abb. 86 in Kap. 3.1.6.7), hingegen bricht bei für Muschelhämozyten unphysiologischen 37 °C die Phagozytoseaktivität ein. Muscheln, die an eine höhere physiologisch relevante Temperatur (21,0 °C) angepasst sind zeigten bessere Steigerungsraten als Muscheln, die an niedrigere Temperaturen (6,2 °C) angepasst wurden. Da es sich bei der Phagozytose um eine Abfolge aktiver Prozesse handelt, lässt sich die Steigerung bis zum optimalen Temperaturbereich wie bei anderen physiologisch relevanten Größen gut herleiten. So korrelieren die Filtrationsraten von Teichmuscheln mit der Wassertemperatur [108], oder der Energiestoffwechsel der Körbchenmuschel (*Corbicula fluminea*) kann temperturabhängig erhöht werden [123]. Eine Versuchstemperatur von 25 °C wurde als optimale Temperatur für Phagozytosemessungen verwendet, da diese auch bei verschiedenen Hälterungsbedingungen der Entenmuscheln eine höhere Phagozytoseaktivität zeigt und unter Laborbedingungen gut einzuhalten ist.

Einfluss der Hälterungstemperatur

Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung der Hämozyten steigen mit zunehmender Hälterungstemperatur in einem Temperaturbereich zwischen 7,8 und 21,2 °C bei gleichen Messintervallen (siehe Kap. 3.1.6.5) an, was auf Adaptationsvorgänge schließen lässt. Je näher die Hälterungstemperatur an der Versuchstemperatur lag, desto höher war die Phagozytoseaktivität. Wechselwarme Organismen verfügen jedoch über eine Reihe von Kompensationsmechanismen, die Adaptationsprozesse steuern und nicht immer einen Verlauf der Stoffwechselsteigerung nach der van`t Hoff`schen Regel bewirken [124]. So scheinen auch Teichmuscheln ihre Phagozytoseaktivität bei einer Temperaturerhöhung partiell kompensieren zu können. Der Steigerungsfaktor bei 10 °C Temperaturdifferenz von 11,2 °C auf 21,2 °C der Hälterungstemperatur liegt unter 1,5 nach 6 h Versuchszeit. Bei niedrigeren Anpassungstemperaturen, wie von 7,8 °C auf 15 °C, errechnet sich ein höherer Q₁₀-Wert von 1,9, was ein geringfügig größeres Steigerungspotenzial anzeigt. Die Hälterungstemperatur von 21,2 °C ist physiologisch für Muscheln recht hoch (siehe Abb. 136 in Kap. 3.5) und liegt nah an Bedingungen bei denen sich eine positive Korrelation von Hälterungstemperatur und Phagozytoseaktivität in der Rheinwasserhälterung verliert, siehe Kap. 4.4.2. Die Muscheln erreichen bei höheren Temperaturen den Maximalbereich ihrer Phagozytoseantwort.

Phagozytosekinetiken

In einem Temperaturbereich zwischen 7,8 und 21,2 °C steigen die Messparameter Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE) linear in einem Zeitraum bis 6 h (siehe Kap. 3.1.6.6), mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit < 0,1 % an. Beide Messparameter erhöhen sich temperaturabhängig. Unter chemisch unbelasteten Bedingungen kann sowohl der Phagozytoseanteil als auch die Phagozytoseleistung (GE) als Maß für die Phagozytoseaktivität benutzt werden. Die Messparameter der Phagozytoseaktivität aus den Versuchen mit Säugerzelllinien sind auf Muschelhämozyten von *Anodonta anatina* übertragbar und untereinander vergleichbar.

4.2.5 Vitalitätsmessungen von Muschelhämozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vitalität der Hämozyten zu zwei Zeitpunkten festgestellt, bei der Entnahme und nach dem Phagozytoseansatz. So wurden die mittleren vitalen Hämozytendichten der durch Punktion gewonnenen Hämolymphen durch eine Zählung in der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblaufärbung bestimmt. Im Anschluss an den Phagozytoseansatz standen zwei durchflusszytometrische Methoden mit den DNA Farbstoffen Sytox-Green und Propidiumjodid zur Verfügung, die nekrotische Zellanteile, also späte zytotoxische Effekte, anzeigen konnten. Die durchflusszytometrischen Vitalitätsbestimmungen wurden *in vitro* und nach den *In vivo*-Expositionen von Teichmuscheln mit Referenzsubstanzen und Abwasserproben durchgeführt. Die Methoden werden in Kap. 4.5.1 vergleichend diskutiert.

4.2.6 Versuche mit Xenobiotika

Modulierende Effekte von unterschiedlichen Xenobiotika auf die Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten konnten *in vitro* nachgewiesen werden [35] [82] [84] [78] [89] [95] [97] [85] [94].

Auch für Hämozyten aus dem verwendeten Testorganismus *Anodonta anatina* konnten modulative Wirkungen von Xenobiotika auf die Phagozytoseaktivität gemessen werden (siehe Kap. 3.2.2 bis 3.2.4). Mit den gemischten Hämolymphen mehrerer Individuen aus der Laborhälterung war es möglich, *In vitro*-Versuchen mit Schwermetallverbindungen, diversen Pharmazeutika, PAK und PCB auf die Phagozytoseaktivität durchzuführen. Die Auswahl erfolgte aus dem Spektrum an Xenobiotika, für die immunmodulative Effekte an Muscheln nachgewiesen wurden (siehe Tab. 3 in Kap. 1.2.5). Schwer wasserlösliche Verbindungen wie PAK und PCB wurden mit Ethanol als Löslichkeitsvermittler bis zur Wasserlöslichkeitsgrenze der Substanzen getestet; dabei blieben die Negativkontrollen mit entsprechendem Ethanolanteil (Testkonzentration 0,2%) unbeeinflusst.

Schwermetallwirkungen auf die Phagozytoseaktivität

Die Schwermetallverbindungen zeigten sigmoidale Konzentrations-Wirkungsbeziehungen in der Phagozytoseleistung (GE) bei logarhithmischer Auftragung der Probenkonzentration (siehe Kap. 3.2.2), die mit einem 4-parametrischen logistischen Modell beschrieben und ausgewertet werden können. Der mittlere prozentuale Variationskoeffizient bei einer Dreifachbestimmung liegt bei ca. 8%. Die Hemmwirkungen der unterschiedlichen Schwermetalle können mehrere Zehnerpotenzen in der Stoffmengenkonzentration auseinander liegen. Die höchste Hemmwirkung zeigte das CH₃HgCl, und die geringste Hemmwirkung wurde durch das NiCl₂ erreicht, wobei die EC₅₀-Werte der Konzentration um den Faktor 600 differierten. Die Hemmwirkung nahm in folgender Reihenfolge ab: CH₃Hg >Hg >Cu >Cd >Ni. Diese Reihenfolge stimmt mit anderen Literaturquellen überein, so wird z.B. in [78] eine durch-schnittliche Reihenfolge der Hemmwirkung bei 6 verschiedenen Muschelarten von CH₃Hg > Hg > Ag > Cd > Zn beschrieben. Die EC₅₀-Werte sind ebenfalls für CH₃Hg, Hg und Cd vergleichbar (siehe Tab. 17) und wurden aus durchflusszytometrischen Messungen mit einem gleichem Bead zu Hämozyten-Verhältnis von 100 zu 1 bestimmt.

Tab. 17: Speziesbedingte EC₅₀-Werte von Schwermetallen der *In vitro*-Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten. Vergleichswerte wurden aus [78] entnommen, Angaben in mol/I Probenkonzentration.

Spezies	CH₃Hg [mol/l]	Hg [mol/l]	Cd [mol/l]
Cyrtodaria siliqua	2,4 x 10 ⁻⁵	6,0 x 10 ⁻⁵	n.b.
Dreissena polymporpha	1,8 x 10 ⁻⁶	7,9 x 10 ⁻⁶	4,7 x 10 ⁻⁴
Elliptio complanata	1,8 x 10 ⁻⁵	2,9 x 10 ⁻⁵	1,2 x 10 ⁻³
Mactromeris polynyma	1,1 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻⁴	> 10 ⁻³
Mya arenaria	2,6 x 10 ⁻⁶	5,2 x 10 ⁻⁵	> 10 ⁻³
Mya truncata	6,4 x 10 ⁻⁵	3,4 x 10 ⁻⁵	n.b.
Mytilus edulis	1,3 x 10 ⁻⁵	7,3 x 10 ⁻⁵	> 10 ⁻³
Serripes groenlandicus	n.b.	1,9 x 10 ⁻⁴	n.b.
Mittelwert	1,9 x 10 ⁻⁵	6,9 x 10 ⁻⁵	8,4 x 10 ⁻⁴
Anodonta anatina	1,9 x 10 ⁻⁵	7,1 x 10 ⁻⁵	2,0 x 10 ⁻³

Die Tabelle 17 zeigt, dass Muschelhämozyten des gewählten Testorganismus Anodonta anatina für Schwermetallverbindungen eine vergleichbare Sensitivität wie andere marine und limnische Muschelarten aufweisen. Prinzipiell eignen sich daher Muschelhämozyten von Anodonta anatina für ein *In vitro*-Testverfahren mit Indikatorwirkung für akute Effekte auf die Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten, da sie vergleichsweise weder zu sensitiv noch zu unempfindlich reagieren. Allerdings finden akute Wirkungen auf die Phagozytoseaktivität in Konzentrationen statt, die aktuelle Belastungssituationen in Oberflächengewässern in der Regel nicht anzeigen können.

In einem akuten Test, der die Modulation der Phagozytoseleistung erfasst, wird zudem die Reversibilität der Wirkung nicht bestimmt. Eine Nachhaltigkeitsaussage zu den bestimmten Wirkungen ist daher ohne Nachversuche unzulässig und kann zu falsch positiven Aussagen über das immuntoxische Potenzial von Substanzen führen, wenn die zeitliche Belastungssituation ungeklärt ist. Versuche zur Hemmwirkung von Schwermetallen auf die Phagozytoseaktivität ergaben, dass die Wirkungen irreversibel oder reversibel sein können (siehe Abb. 108 in Kap. 3.2.3). Für Nickel und Methylquecksilber konnte eine irreversible Wirkung nachgewiesen werden, hingegen bewirkten Kupferexpositionen eine Regeneration der Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten 24 h nach der Exposition.

Bei einigen Schwermetallverbindungen, z.B. bei Methylquecksilberchlorid und Quecksilberdichlorid, traten in niedrigen Konzentrationsbereichen starke Aktivierungseffekte (bis zu 30% gegenüber den Negativkontrollen) auf. Hingegen zeigen sich um den EC₅₀-Wert drastische Hemmwirkungen. Aufgrund der gezeigten prozentualen Variationskoeffizienten, die zwischen 5 und 8% im Dreifachansatz lagen, kann ein 20%iger Effekt (EC₂₀) als sichere Nachweisgrenze bei einer Normalverteilung der Daten angenommen werden, da über 95% der Daten innerhalb von 2 Standardabweichungen um den Mittelwert liegen [115]. Ähnliche Aktivierungen der Phagozytoseaktivität werden mit *In vitro*-Testverfahren an verschiedenen Muschelarten in niedrigen Konzentrationsbereichen für verschiedene Schwermetallverbindungen beschrieben [78]. Diese Effektumkehr bei niedrigen Konzentrationen ist nicht auf Muscheln begrenzt, sondern wurde z.B. bei Reptilien, Fischen, Vögeln, Nagern und Primaten berichtet [35].

Dieses konzentrationsabhängige Verhalten der Phagozytoseaktivität wird, z.B. in [19] mit dem Begriff von "biphasischen Antwortmustern" der Phagozytoseaktivität belegt oder als Beispiel für ein Hormesis- ähnlichen Effekt diskutiert [19] [26]. Die biochemischem Ursachen für die Aktivierungen der Phagozytoseaktivität können hier nicht ergründet werden, doch tritt diese Art "Stressaktivierung" sowohl auf der *In vitro*-, als auch auf der *In vivo*-Ebene mit Referenzsubstanzen (siehe Kap. 4.3.1) auf und wird im Folgenden als Begriff bevorzugt. Es ist anzunehmen, dass die Phagozytose einen adaptiven Prozess innerhalb der allgemeinen Stressantwort darstellt. Auf die Sensitivitätsgrenzen der getesten *In vitro*-Methoden mit Muschelhämozyten und Säugerimmunzellen wird ausführlich in Kap. 4.5.2 eingegangen, doch liegen diese weitgehend über umweltrelevanten Konzentrationsbereichen.

Sensitivitätsspektrum der Phagozytoseaktivität für andere Xenobiotika

Mit Muschelhämozyten wurden jeweils 2 umweltrelevante PAK und der PCB sowie 5 Pharmazeutika, für die immunmodulierende Effekte beschrieben sind (siehe Tab. 3 in Kap. 1.2.4), im *In vitro*-Ansatz auf Ihre Wirksamkeit getestet. Dabei wurden Konzentrationen eingesetzt, die weit über den Belastungssituationen von kommunalem Abwasser und Oberfächenwässern liegen (siehe Kap. 3.2.4). Nur ein Wirkstoff von Kontrazeptiva, das 17- α -Ethinylestradiol und das Antibiotikum Tetrazyklin zeigten Effekte auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten. Doch traten die Wirkungen wie bei den Schwermetallverbindungen (siehe Kapitel 3.2.2) in Konzentrationsbereichen auf, die keine oder zumindest nur punktuelle Umweltrelevanz besitzen.

In Fließgewässern ist 17- α -Ethinylestradiol in der Regel nicht über der Bestimmungsgrenze von 0,5 ng/l nachweisbar, und die in Kläranlagenabläufen gemessenen Konzentrationen liegen im unteren ng/l Bereich [125]. Der gefundene EC₅₀-Wert liegt zwischen 0,1 und 1 mmol/l, also liegt die Massenkonzentration zwischen 29,6 und 296 mg/l und ist mehr als 6 Größenordnungen von in der Umwelt auftretenden Konzentrationen entfernt. Das 17- α -Ethinylestradiol wurde gegenüber dem natürlich vorkommenden 17- β -Estradiol bevorzugt, da es wesentlich längere Halbwertszeiten in Kläranlagen besitzt und seine estrogene *In vivo*-Aktivität ca. 25fach höher liegt als beim 17- β -Estradiol [1].

Die Belastung kommunaler Abwässer mit Tetrazyklinen wird mit ca. 0,2 μ g/l angegeben, was ca. 0,43 nmol/l entspricht [95], wobei der gefundene EC₅₀-Wert zwischen 10 und 50 μ mol/l liegt und mehr als 3 Zehnerpotenzen von Umweltkonzentrationen entfernt ist. Die Empfindlichkeit für Umweltprobenuntersuchungen der erarbeiteten *In vitro*-Testverfahren für Phagozytoseaktivität ist demnach anzuzweifeln und wurde mit *In vivo*-Folgeversuchen mit Referenzsubstanzen in Relation gesetzt .(siehe Kap. 4.5.3)

4.2.7 Die ROS-Produktion der Hämozyten

Muschelhämozyten sind in der Lage, verschiedene ROS intra- und extrazellulär zu bilden (siehe Kap. 1.2.4.2). *In vitro*-Ansätze zur Messung der ROS-Produktion wurden schon mehrfach an Muschelhämozyten angewendet [86] [89] [94] [97] [65] [23] [46] [39] [63] und konnten z.B. modulierende Wirkungen auf die ROS-Produktion von Organozinnverbindungen [86], Benzo(a)pyren [89], Flammenschutzmittel [94] und hormonaktive Substanzen [97] nachweisen. Dabei wurden unterschiedliche methodische Ansätze verfolgt. So kann die Superoxidaniongenerierung extrazellulär durch Oxidation von Cytochrom c angezeigt werden [97] [94], die intrazelluläre Produktion, z.B. durch den NBT-Assay (nitroblue tetrazolium reduction assay) [89] [97]. Gängige Verfahren sind auch die Chemilumineszenz von oxidativen Prozessen, z.B. durch die Zugabe von Luminol zu verstärken und nachzuweisen [86] oder Fluoreszenzmessungen an Substraten wie Dichlorofluoresceindiacetat (DCFH-DA) oder 1,2,3 Dihydrorhodamin (DHR) durchzuführen, die nach Oxidation mit H₂O₂ fluoreszent werden [63] [39].

PhenoIrotmethode

Eine andere Methode, die ROS-Produktion zu bestimmen, ist die Messung der Extinktionszunahme von oxidierten Phenolrot (siehe Kap. 2.4.7.1). Diese Methode wurde ursprünglich an Säugerzellkulturen entwickelt [64], wurde dann aber von Pipe [65] auf Muschelhämozyten von *Mytilus edulis* übertragen. Phenolrot wird bei vielen Zellkultivierungen eingesetzt, da für einen weiten Konzentrationsbereich keine toxischen Effekte nachgewiesen wurden. Es ist anzunehmen, dass Phenolrot auch keine immunmodulativen Wirkungen besitzt, zumal es von Zellen nicht aufgenommen wird. Die Phenolrotmethode konnte in dieser Arbeit auch auf die vergleichsweise geringen Hämozytendichten von *Anodonta anatina* (die um den Faktor 5 bis 10 geringer liegen als bei *Mytilus edulis*) übertragen werden und hat den Vorteil, dass sie nun eine kontinuierliche photometrische Messung reaktiver Sauerstoffspezies mit Anodontenhämozyten erlaubt und nur einen geringen Einsatz an Hämozyten erfordert.

Da der pH-Wert durch den Anodontenpuffer im Testansatz mit Muschelhämozyten normiert und Wasserstoffperoxid durch die Meerrettichperoxidase abgefangen wird, kann auf dieser Grundlage eine Änderung der optischen Dichte in eine Radikalproduktion an H₂O₂-Äquivalenten pro Zeiteinheit umgerechnet und angegeben werden. Phenolrot besitzt fast keine Membrangängigkeit, damit wird vorwiegend extrazelluläre H₂O₂-Produktion erfasst. Durch die kurze Lebensdauer von Superoxidanionen und deren spontane Zerfallsmöglichkeit (siehe Kap. 1.2.4.2) zu H₂O₂, bestimmt die Phenolrotmethode auch einen Teil der disproportionierten Superoxidanionen der ROS-Produktion mit. Die Phenolrotmethode kann extrazelluläre ROS-Produktionen anzeigen und bietet eine sinnvolle Erweiterung des Messparameters der intrazellulären Phagozytoseaktivität.

Kalibrationsmessungen

In Konzentrationsbereichen bis 15 μ mol H₂O₂ im Testansatz zeigt die Methode eine hohe lineare Korrelation zu getesteten H₂O₂-Konzentrationen im Testansatz (siehe Abb. 86 in Kap. 3.1.8.1). Doch verliert sich diese Korrelation durch die zunehmende Säurewirkung des H₂O₂.

Der Messbereich hätte durch Normierung des pH-Wertes durch Zugabe von NaOH erweitert werden können [64].

Kinetik der Radikalproduktion

Im Testansatz mit Muschelhämozyten konnte mit Einzel- und Mischhämolymphe die Kinetik der Radikalproduktion verfolgt werden. Kurz nach der Entnahme der Hämolymphe befindet sich die Radikalproduktion auf einem Maximum und verringert sich mit zunehmender Versuchszeit (siehe Abb. 89 und 93 in Kap. 3.1.8). Für Mischhämolymphe konnte eine Halbierung der Radikalproduktion in Zeitabständen von jeweils 4 h mit 50000 Hämozyten im Testansatz gemessen werden. Auch nach 10 h Versuchszeit waren mehr als 1 µmol/h H₂O₂ Radikaläquivalente in Mischhämolymphe zu messen. Die Radikalproduktion im Testansatz steigt mit zunehmender Hämozytenzahl (siehe Abb. 89 in Kap. 3.1.8.2) proportional, daraus konnte eine optimale Hämozytenzahl von 50000 bestimmt werden. Die Kinetiken der Einzelhämolymphen von Entenmuscheln aus der Rheinwasserhälterung (siehe Abb. 93 in Kap. 3.1.8.4) zeigten in 8 von 10 Fällen vergleichbare Verläufe. 2 Einzelhämolymphen zeigten eine mehr als doppelt so hohe Radikalproduktion. Ursachen oder eine methodische Fehlerquelle konnten für diese Aktivierung nicht gefunden werden. Es kam auch zu keinen pH-Wert bedingten Farbumschlägen des Phenolrots wie bei den Kalibrationstestungen mit höheren H₂O₂ Konzentrationen (siehe Kap. 3.1.8.1). Auch führte der Einsatz von nur 50000 Hämozyten aus Anodontenhämolymphe gegenüber den vergleichsweise hohen Hämozytenzahlen von Mytilushämolymphe (mit ca. 400000 Hämozyten im Testansatz [65]) zu geringerer Wasserstoffperoxid-Produktion, die aber noch gut messbare Signalstärken erzeugten (siehe Abb. 89 in Kap. 3.1.8.2).

Ob die Entenmuscheln in der Laborhälterung eine homogenere Radikalproduktion zeigen, wurde im Rahmen der Abwasserversuchen untersucht (siehe Kap. 3.4). Als geeignete Messgröße zur Bewertung der Radikalproduktion hat sich die Bildung von Radikalsummen über ein Zeitintervall bewährt und wurde für Stimuliversuche, *In vitro*-Hemmversuche und *In vivo*-Abwasserversuche als Bewertungskriterium der Radikalproduktion eingesetzt.

Stimuliversuche der ROS-Produktion von Muschelhämozyten

Hämozyten anderer Muschelarten (*Mytilus edulis, Mytilus galloprovincialis, Crassostrea virginica, Crassostrea gigas* und *Geukensia demissa*) benötigen, z.B. einen Stimulus durch Zymosan (Zellwandbestandteile von Hefen), um ROS generieren zu können [61] [65] [86] [89]. Bei anderen Muschelarten (*Mya arenaria* und *Mercenaria mercenaria*) zeigt Zymosan kaum Effekte auf die ROS-Produktion der Hämozyten [61]. Die Mechanismen der ROS-Stimulation scheinen artspezifisch variieren zu können.

Ob sich auch die extrazelluläre ROS-Produktion von Anodontenhämozyten durch vergleichbare Stimuli erhöhen lässt, sollte ein Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an *E. coli*-Bakterien und Latexpartikeln ergeben. Um individuelle Schwankungen zu nivellieren und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Stimulitestungen mit Mischhämolymphe durchgeführt. Das Ausgangslevel der ROS-Produktion wurde durch die Verwendung von Mischhämolymphe im Vergleich zu Einzelhämolymphen als Folge einer Interimmunreaktion angehoben (siehe Abb. 89 und 93 in Kap. 3.1.8). Die ROS-Produktion der Mischhämolymphe konnte in den ersten 4 h durch Latexpartikel um ca. 20% gegenüber den Negativkontrollen stimuliert werden (siehe Abb. 91 in Kap. 3.1.8.3). Hingegen führten die verwendeten *E. coli*-Konzentrationen zu keiner Steigerung der ROS-Produktion. Wahrscheinlich waren die gewählten Konzentrationen der *E. coli*-Bakterien zu gering oder wurden durch die Interimmunreaktion überlagert.

Unerwartet zeigte sich 1% Ethanol im Testansatz als wesentlich stärkerer Stimulus und bewirkte eine Steigerung von mehr als 40% in der ROS-Bestimmung. Die Wirkung wurde daraufhin nachgetestet und zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit zwischen 0,25 bis 10% Testansatzkonzentration (siehe Abb. 92 in Kap. 3.1.8.3). Als mögliche Ursachen könnte ein zusätzlicher Stressfaktor der Hämozyten und eine Erhöhung der Membrangängigkeit durch Ethanol für Radikale und Phenolrot zu nennen sein, die eine zusätzliche Erfassung der intrazellulären ROS ermöglicht und das Antwortsignal verstärkt. Eine direkte Stimulation der für die Radikalproduktion verantwortlichen NADPH-Oxidasen durch Ethanol ist in der Literatur nicht beschrieben. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in kurzen Messintervallen überwiegend extrazelluläre Radikalproduktionen bestimmt werden, die von Phagozytoseprozessen nur geringfügig gesteigert werden können. Das Phenolrot muss erst durch Endozytose aufgenommen werden, um Radikalbildungen in den Phagosomen anzuzeigen. Die relativ niedrige phagozytoseassoziierte ROS-Produktion kann auch durch eine langsamere Antwortmöglichkeit der Zellen bedingt sein, da die Phagozytoseprozesse bei Anodontenhämozyten erst kontinuierlich einen erhöhten Radikalbedarf intrazellulär bewirken. Damit bietet die Phenolrotmethode bei einem konstanten pH-Wert eine gute Möglichkeit, kurzfristige extrazelluläre Veränderungen der ROS-Produktion anzuzeigen ,und kann als ergänzender Immunparameter zur Phagozytosemessung herangezogen werden. In kurzen Messintervallen wird vornehmlich nicht die phagozytoseassoziierte intrazelluläre Radikalbildung angezeigt. Die Hämozyten von Anodonta anatina geraten wenige Minuten nach der Entnahme in einen "Alarmzustand" und zeigen maximale ROS-Produktion. Zusätzliche Stimuli sind für eine Messung der ROS nicht notwendig.

Schwermetalleinfluss auf die ROS-Produktion

In vitro-Einflüsse von Xenobiotika auf die ROS-Produktion wurden mehrfach beschrieben [86] [89] [94] [97] und sollten auch an Anodontenhämozyten getestet werden. Da sich für alle getesteten Schwermetallverbindungen (siehe Kap. 3.2.2) Hemmwirkungen auf die Phagozytoseaktivität nachweisen ließen, wurden diese Substanzen auch mit der Phenolrotmethode getestet.

Die *In vitro*-Versuche der ROS-Produktion mit Schwermetallen ergaben Aktivierungen der Radikalproduktion in niedrigeren Konzentrationsbereichen, gefolgt von Hemmungen der ROS-Produktion bei höheren Konzentrationen (siehe Abb. 109 in Kap. 3.2.5), ähnlich der "Stressaktivierung" der Phagozytoseaktivität. Solche Aktivierungen der ROS-Produktion werden auch *in vitro* für Xenobiotika, z.B. Benzo(a)pyren, in nicht zytotoxischen Konzentrationsbereichen beschrieben [89]. Kontrollversuche zur Hemmwirkung der Schwermetalle auf die Meerrettichperoxidase zeigten, dass auch bei den höchsten Schwermetallkonzentrationen genügend Restaktivität der Meerrettichperoxidase vorhanden war, um Oxidationsprozesse zu katalysieren. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen ergeben sich daher aus der Schwermetallwirkung. Die höchsten getesteten Schwermetallkonzentration von CH₃HgCl, HgCl₂ und CdCl₂ führten durch pH-Wert Beeinflussung zu Farbumschlägen des Phenolrots (siehe Abb. 28 in Kap. 2.4.7.4) was durch entsprechende Blindproben berücksichtigt werden konnte.

Der *In vitro*-Ansatz zur Messung von Schwermetallwirkungen auf die ROS-Produktion (siehe Abb. 109 in Kap. 3.2.5) zeigte sich aber noch unempfindlicher als der Messparameter der Phagozytoseaktivität (siehe Kap. 3.2.2 und 4.2.6). Es überlagern sich zytotoxische und immuntoxische Effekte (siehe Kap. 3.1.7 für NiCl₂). *In vitro*-Versuchen mit Muschelhämozyten von *Anodonta anatina* eignen sich nicht, um xenobiotische Einflüsse auf die Immunparameter Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion in umweltrelevanten Konzentrationsbereichen zu erfassen.

Die *In vitro*-Versuche sind wahrscheinlich nur auf hochbelastete Abwasserproben oder ähnliche Matrixes anwendbar und zeigen keine spezifische Hemmwirkung auf die Phagozy-toseaktivität oder ROS-Produktion durch xenobiotische Einflüsse an.

4.3 *In vivo-*Laborexposition mit Entenmuscheln

Zusammenfassung

Die Phagozytoseaktivität nach In vivo-Expositionen von Muscheln stellt wohl den am besten untersuchten Immunparameter dar. Zahlreiche immunmodulierende Einflüsse von diversen Xenobiotika konnten an der Phagozytoseaktivität nach In vivo-Expositionen nachgewiesen werden [43] [79] [76] [81] [83] [88] [90] [77] [51] [91] [92] [96] [97] [98].

Durch die relative Unempfindlichkeit der erarbeiteten In vitro-Methoden für akute immuntoxische Wirkungen, die zwar teilweise auch für andere Muscheln belegt werden kann (siehe Tab. 17 in Kap. 4.2.6), wurden in der nächsten Erfassungsebene (siehe Abb.153 in Kap. 4) In vivo-Expositionen von Entenmuscheln untersucht.

Ausgehend von den Erfahrungen der In vitro-Versuche mit Schwermetallen wurden Expositionsszenarien mit 1/100, 1/1000 und 1/10000 der In vitro-Nachweisgrenzen für die Schwermetallverbindungen mit der geringsten (NiCl₂ mit 614 mg/l) und der höchsten (CH₃HgCl mit 4,25 mg/l) Hemmwirkung durchgeführt. Es wurden Immunmodulationen der Messparameter für Phagozytoseaktivität zu den Expositionsintervallen 0, 1, 3, 7 und 14 d erfasst. Von insgesamt 128 eingesetzten Muscheln verstarben nur 4 nach 7tägiger Exposition mit der höchsten Nickeldichlorid-Konzentration von 6,14 mg/l. Eine zweiwöchige Exposition mit täglichem Wasserwechsel ist geeignet, um subletale Effekte an Entenmuscheln anzuzeigen. Bei beiden Schwermetallverbindungen zeigten sich signifikant stimuliernende undt hemmende Effekte auf die Phagozytoseaktivität. Es traten charakteristische Antwortmuster bei beiden Schwermetallexpositionsintervallen (1 d und 3 d) und die Hemmwirkungen bei den längeren Expositionsintervallen (7d und 14 d) einsetzten. Die Empfindlichkeit der Expositionsantwort lag mindestens um 3 Zehnerpotenzen in der Konzentration höher, als bei den In vitro-Versuchen mit Muschelhämozyten.

Zusätzlich wurde das bioakkumulative Verhalten der Entenmuscheln während der Expositionsversuche untersucht. Für Methylquecksilberchlorid konnten konzentrationsabhängig lineare Korrelationen zur Expositionszeit gefunden werden. Nach 14 d Expositionszeit wurden Bioakkumulationsfaktoren zwischen 400 und 1600 gefunden. Die Bioakkumulation von Nickel verlief nicht linear zur Expositionszeit, und es wurden im Vergleich zur Methylquecksilber-Exposition wesentlich geringere Bioakkumulationfaktoren erreicht. Insgesamt eignen sich die Bioakkumulationsergebnisse nicht, um Aussagen über das immunmodulierende Potenzial treffen zu können. NiCl₂ akkumuliert in der höchsten Konzentration nach 7 Tagen kaum, zeigt aber hoch signifikante Hemmwirkung auf die Phagozytoseleistung. Der immunologische Belastungszustand ist generell nicht am bioakkumulativen Verhalten der Testorganismen für Referenzsubstanzen zu bestimmen.

Eine Übertragbarkeit der Expositionsbedingungen der Entenmuschelversuche wurde auf Umweltproben getestet. Zwei Abwasserprobenpaare aus Zu- und Ablauf einer kommunalen und einer industriellen Kläranlage eines metallverarbeitenden Industriebetriebes wurden vom LANUV-NRW für Versuche zur Verfügung gestellt und mit Algen-, Daphnien- und Leuchtbakterientest auf allgemeintoxische Potenziale untersucht. Ausgehend von den Verdünnungsstufen der Abwasserproben, in denen kein toxischer Effekt mehr nachzuweisen war, wurden Muschelexpositionen durchgeführt und die Immunparameter der Phagozytoseaktivität (PL (GE), PA, PL (PE)), der ROS-Produktion, der vitalen Hämozytendichte und nekrotische Zellanteile erfasst. Diese Vorgehensweise sollte einen Vergleich ermöglichen, ob allgemeintoxische Potenziale und immuntoxische Potenziale verschiedener Abwasserproben in getrennten Konzentrationsbereichen erfasst werden können. Die 4 Abwasserprobenverdünnungen sowie eine Positivkontrolle mit 1,1 mg/l Nickeldichlorid und die entsprechende Negativkontrolle wurden mit jeweils 6 Entenmuscheln über eine Expositionszeit von 2 Wochen mit täglichem Wasserwechsel getestet. Alle 4 funktionellen Immunparameter der Phagozytoseaktivität und der ROS-Produktion wurden durch die Positivkontrolle verändert, was die Funktionalität des Ansatzes, bzw. eine wiederholt induzierbare Immunmodulation durch Nickeldichlorid, unterstreicht. In den Zuläufen wurden jeweils größere immunmodulierende Potenziale gefunden, als in den entsprechenden Abläufen. Das industrielle Abwasser zeigte für den Zu- und Ablauf größere Immunmodulation, als das entsprechende kommunale Abwasser, was trotz der unterschiedlichen Verdünnungsstufen von 1 zu 8 gegenüber 1 zu 64 die hohe Belastungsqualität der industriellen Abwasserproben anzeigt. Durch die Verwendung mehrerer funktioneller Immunparameter lässt sich das immunmodulierende Potenzial auch in Verdünnungsstufen klassifizieren und vergleichen, in denen keine allgemeintoxischen Effekte zu bestimmen sind. Die Entenmuscheln der Versuchsbedingungen mit den stärksten immunmodulierenden Effekten (Zulauf ind. Abwasser und Positivkontrolle) wurden nach der Punktion für 3 Wochen in die Laborhälterung übernommen. Anschließend wurden die Messparameter der Abwasserexposition erneut bestimmt. Es zeigte sich, dass die ROS-Produktion der Entenmumuscheln nach 3 Wochen Regenerationszeit auf das Ausgangsniveau vor den Expositionsversuchen zurückgegangen war. Allerdings hatte sich die durch die Exposition signifikant gehemmte Phagozytoseaktivität auf ein Niveau über den unbelasteten Ausgangszustand angehoben. Eine immunmodulatorische Stimulation der Phagozytoseaktivität als verspätete Stressantwort nach der Exposition und anschließender Regenerationsphase kann nicht ausgeschlossen werden. Ähnliche Effekte wurden auch bei geringeren Expositionsintervallen und Referenzsubstanzkonzentrationen als sogenannte "Stressaktivierung" mit Referenzsubstanzen (Nickeldichlorid und Methylquecksilberchlorid) beobachtet.

4.3.1 In vivo-Versuche mit Referenzsubstanzen

Bevor Expositionen mit Entenmuscheln durchgeführt wurden, fand mindestens eine dreiwöchige Laborhälterung der Muscheln statt, um eine Temperaturadaptation und eine teilweise Entgiftung zu ermöglichen. Innerhalb von 3 Wochen kann eine vollständige Regeneration der vitalen Hämozytendichten und der Phagozytoseaktivität erfolgen (siehe Kap. 3.1.4.4). Ausgehend von den Erfahrungen mit den I*n vitro*-Versuchen mit Schwermetallen wurden Expositionsszenarien mit 1/100, 1/1000 und 1/10000 der *In vitro*-Nachweisgrenzen für die Schwermetallverbindungen mit der geringsten (NiCl₂ mit 614 mg/l) und der höchsten (CH₃HgCl mit 4,25 mg/l) Hemmwirkung durchgeführt (siehe Tab. 6 in Kap. 2.3.3.3). 4 Expositionsintervalle in den Abständen 1 d, 3 d, 7 d und 14 d wurden vom Ausgangszeitpunkt getestet. Dabei fand ein täglicher Wasserwechsel statt, um eine Selbstvergiftung der Muscheln durch Ausscheidungsprodukte zu minimieren und die Expositionskonzentrationen während des Versuchszeitraumes annähernd konstant zu halten. Diese Versuche hatten die Ermittlung geeigneter Expositionsintervalle für die Bestimmung subletaler immunmodulierender Potenziale zum Ziel.

Mortalität während der Exposition

Von insgesamt 128 eingesetzten Entenmuscheln verstarben nur 4 Muscheln in der höchsten NiCl₂-Konzentration von 6,14 mg/l nach 7 d Exposition (siehe Tab.6 in Kap. 2.2.3.3). Eine 2-wöchige Exposition mit täglichem Wasserwechsel ist geeignet, um subletale Effekte an Entenmuscheln anzuzeigen.

Immunmodulationen während der Expositionen

Die Phagozytoseaktivität wurde durch den Messparameter Phagozytoseleistung (GE) dargestellt, da dieser teilweise die Messparameter Phagozytoseleistung (PE) und den Phagozytoseanteil integriert.

Es zeigten sich während der Exposition sowohl signifikant stimulierende, als auch signifikant hemmende Effekte auf die Phagozytoseaktivität bei beiden Schwermetallverbindungen (siehe Kap. 3.3). Dabei traten charakteristische Antwortmuster auf, bei denen Aktivierungen meist bei kurzen Expositionsintervallen (1 d, 3 d) und Hemmungen meist bei längeren Expositionsintervallen (7 d, 14 d) stattfanden (siehe Kap. 4.6). Hingegen wies die niedrigste NiCl₂-Konzentration signifikante Aktivierungen ("Stressaktivierung") bei den längeren Expositionsintervallen und keine Hemmungen der Phagozytoseaktivität auf. Da das Expositionsintervall von 14 d beide Antwortrichtungen der Phagozytoseaktivität und stärker subchronische Effekte anzeigen kann, wurde es als geeignetes Expositionsintervall für Immunmodulationen identifiziert.

Diese konzentrationsabhängige biphasische Antwort der Phagozytoseaktivität auf Schwermetallexposition wurde z.B auch bei *Mytilus edulis* nach 7 tägiger Exposition mit Kupferlösungen beschrieben [43]. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde die Phagozytoseaktivität stimuliert, bei hohen Konzentrationen gehemmt. Dieses Antwortmuster muss aber nicht bei allen Muschelarten auftreten, so wird z.B. in [83] von *Mya arenaria* nach Exposition mit CH₃HgCl in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l eine über die Zeit kontinuierlich abnehmende Phagozytoseantwort zu den Zeitpunkten 7, 14, und 21 d berichtet. Niedrigere Konzentrationen (10⁻⁷ bis 10⁻⁹ mol/l) zeigten keine Effekte, eine höhere Konzentration (10⁻⁵ mol/l) führte zum Tod der Versuchstiere nach 7 d. Die hier gefundene Nachweisgrenze von 10⁻⁶ mol/l entspricht einer Expositionskonzentration von ca. 251 µg/l an CH₃HgCl. Mit Anodonta anatina konnte eine signifikante Hemmung der Phagozytoseantwort bei 4,25 µg/l nach 7d und bei 0,425 µg/l nach 14 d gefunden werden (siehe Abb. 109 und 110 in Kap. 3.3.1). Damit reagierte Anodonta anatina erheblich empfindlicher auf Methyquecksilberchlorid als Mya arenaria. Eine artspezifische Unterschiedlichkeit von mehreren Immunreaktionen (u.a. Phagozytoseaktivität, ROS-Produktion, Hämozytendichten) konnte auch zwischen den marinen Muschelarten Mytilus edulis, Cerastoderma edule und Ensis siligua nach Phenanthren-Exposition bechrieben werden [88], wobei die unterschiedliche Physiologie der Versuchstiere das bioakkumulative Verhalten, die Metabolisierung und Detoxifikationen und letztendlich die Sensitivität der Versuchstiere bestimmt. Bei geschlossenen Schalen können Muscheln auf anaerobe Stoffwechselprozesse umschalten. Diese anaeroben Stoffwechselprozesse haben einen erhöhten Substratbedarf bei gleichem Energiegewinn zur Folge. Deshalb müssen Muscheln für die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten (z.B. Propionat und Acetat) die Schalenschlusszeiten verringern [123] und sind verstärkt den Referenzsubstanzen ausgesetzt, was die Empfindlichkeit der Organismen bei längeren Expositionsintervallen ebenfalls steigert.

Expositionsbedingungen und physiologische Charakteristika der Muscheln können Einfluss auf die Immunparameter haben. So konnte in [76] nachgewiesen werden, dass sich die Stressaktivierung der Phagozytoseaktivität bei *Mytilus edulis* im biphasischen Antwortmuster bei einer Temperaturerhöhung von 10 °C auf 15 °C verstärkt. Die Exposition von Entenmuscheln fand bei einer Raumtemperatur von 22 ± 3 °C statt, hingegen wurde *Mya arenaria* bei 7 bis 8 °C exponiert [83]. Höhere Temperaturen erhöhen in der Regel die Stoffwechselaktivität von Organismen, was auch zu Veränderungen der funktionellen Immunparameter Phagozytoseaktivität, der ROS-Produktion und humoralen Aktivität führen kann (siehe Kap. 1.2.4). Eine temperaturabhängige Veränderung der Empfindlichkeit dieser Immunparameter für Xenobiotika ist ebenfalls anzunehmen.

Da nur 4 Individuen pro Konzentration und Expositionsintervall getestet wurden, konnten aufgrund der Datensatzgröße keine signifikanten Veränderungen der vitalen Hämozytendichte nach den Expositionsintervallen gefunden werden. Andere *In vivo*-Studien berichten auch von Schwermetalleinflüssen auf die Hämozytendichten [43] [36] [76] [81], doch ging es in dem verwendeten Ansatz primär um die Identifizierung geeigneter Expositionsintervalle. Für die statistische Auswertung der Modulationen der Phagozytoseaktivität mussten die Einzelwerte der Mehrfachmessungen der Individuen berücksichtigt werden, auch wenn diese Vorgehensweise die Gefahr einer statistischen Überinterpretation birgt (siehe Kap. 4.3.3). Die Kontrollversuche wurden mit Entenmuscheln aus zwei unterschiedlichen Lieferungen einer Fischköderzuchtteichanlage in der Nähe von Flensburg verwendet, die obwohl sie gleichsam für 3 Wochen im Labor vorgehältert wurden, recht hohe interindividuelle Schwankungen in der Phagozytoseleistung zeigten (siehe Abb 116 in Kap. 3.3.3). Der Median der Phagozytoseleistungen verschob sich in den Kontrollansätzen über die Expositionszeit von 2 Wochen nur geringfügig. Es konnten auch keine signifikanten Aktivierungen oder Hemmungen der Phagozytoseleistung beobachtet werden. Zu den Expositionsintervallen bei 7 und 14 Tagen zeigte sich eine größere Streuung der Phagozytoseleistungen als bei den kurzen Expositionsintervallen. Eine mögliche Erklärung kann der zunehmende Hungerstress der Muscheln liefern, da diese über die gesamte Expositionszeit nicht gefüttert wurden.

Insgesamt ist nicht davon auszugehen, dass die gezeigten Aktivierungen und Hemmungen mit den Referenzsubstanzen durch Artefakte der Expositionsdurchführung überlagert wurden, da ohne Referenzsubstanz keine signifikanten Effekte auftraten und sich auch keine Tendenzen der Antwortrichtung beobachten ließen.

Unter Referenzsubstanzexposition konnten signifikante subletale Modulationen der Phagozytoseaktivität in beide Antwortrichtungen konzentrations- und zeitabhängig beobachtet werden. *In vivo*-Expositionszenarien mit Entenmuscheln können immunmodulative subchronische Wirkungen anhand von Referenzsubstanzen anzeigen. Ein Modell für einen möglichen zeitlichen Verlauf einer Immunmodulation wird in Kap. 4.6 dargestellt. Die Empfindlichkeit der Expositionsantworten liegt um mindestens 3 Zehnerpotenzen in den Konzentrationen höher als für die entsprechenden *In vitro*-Versuche mit Muschelhämozyten (siehe Kap. 4.5.3). Ob sich der immunologische Belastungszustand auch an dem bioakkumulativen Verhalten der Anodonten abzeichnet, sollten Schwermetallanalysen der exponierten Muscheln beantworten.

4.3.1.1 Bioakkumulation von Schwermetallen

Muscheln wurden schon häufig als Indikatororganismen für Schwermetallbelastungen und Umweltverschmutzungen eingesetzt [16] [51] [C126] und zeigten dies durch entsprechende Bioakkumulation an. Teilweise konnten die Bioakkumulation auch mit Immunomodulationen im Freiland in Zusammenhang gebracht werden [51] [24], doch gibt es eine Reihe anderer Faktoren, die Einfluss auf die Immunfunktionen und Bioakkumulation nehmen können. So unterliegen die Immunparameter von Muscheln beispielsweise saisonalen Schwankungen [49], oder das Alter von Entenmuscheln ist ein wesentlicher Faktor für die Bioakkumulation von Schwermetallen [126].

In Laborversuchen mit Muscheln konnten Schwermetallwirkungen auf die Phagozytoseaktivität [83] [43] [76] und auf die ROS-Produktion nachgewiesen werden [80] [66]. In Expositionsversuchen mit HgCl₂ und CH₃HgCl konnte sich die Bioakkumulation in *Mya arenaria* kontinuierlich mit der Expositionszeit steigern [83], wobei sich die Phagozytosaktivität kontinuierlich reduzierte. Bei einer konstanten Expositionszeit von 7d steigt die Bioakkumulation für CdCl₂ in *Mytilus edulis* konzentrationsabhängig [81]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass für einige Umweltchemikalien die Bioakkumulation und die Immunmodulation gleichzeitig und vielleicht stellvertretend Belastungssituationen in Expositionsszenarien anzeigen können. Um dieser These nachzugehen und auch die Aufnahmefähigkeit für Schwermetalle zu untersuchen, wurden die exponierten Muscheln, nachdem sie zur Bestimmung der Immunparameter punktiert worden waren, eingefroren und auf Bioakkumulation untersucht. Es wurde jeweils das gesamte Weichkörpergewebe aller exponierter Muscheln pro Bedingung untersucht, um interindividuelle Einflüsse zu minimieren. Schwermetallkonzentrationen können gewebespezifisch in Entenmuscheln variieren, doch können diese Belastungen im Gesamtgewebe nachgewiesen werden [126].

Bioakkumulation von CH₃HgCl

Für Methylquecksilberchlorid konnten konzentrationsabhängig lineare Korrelationen zur Expositionszeit gefunden werden (siehe Kap. 3.3.4). Nach 2-wöchiger Expositionszeit wurden Bioakkumulationsfaktoren zwischen 400 und 1600 gefunden, doch zeigte die niedrigste Expositionskonzentration die höchsten Bioakkumulationsfaktoren, was eventuell auf Schwellenwertkonzentrationen deutet, bei denen Entgiftungssysteme der Muscheln, z.B. über Metallothioneine, erst angeregt werden müssen. Meidungsmechanismen wie verlängere Schalenschlusszeiten sollten bei längeren Expositionsintervallen eine untergeordnete Rolle einnehmen.

Metallothioneine konnten in nahezu allen eukaryotischen Organismen wie Vertebraten, Invertebraten, Pflanzen, Hefen, aber auch in einigen prokaryotischen Organismen charakterisiert werden und besitzen als komplexbildende Proteine eine wichtige Rolle in der Schwermetall-Detoxifizierung [127]. Für *Anodonta anatina* ist aufgrund der phylogenetischen Konservierung der Entgiftungsmechanismen eine Entgiftungsfunktion über Metallothioneine zu vermuten. Eine Metallothionein-Aktivität konnte auch in Muschelhämozyten von *Crassostrea virginica* nachgewiesen werden [20] und kann durch Schwermetalle induziert werden.

Unter der Annahme, dass Entgiftungsmechanismen bei einem mittlerem Belastungszustand arbeitsfähig sind und einen Teil der Schwermetalle ausschleusen können, lässt sich der niedrige Bioakkumulationsfaktor bei mittlerer Expositionskonzentration erklären (siehe Abb. 120 in Kap. 3.3.5). Möglicherweise gelangen die Entgiftungsmechanismen bei höheren Konzentrationen an ihre Kapazitätsgrenzen, was zu einer erneuten Erhöhung der Bioakkumulationsfaktoren führt. Die absoluten Gewebekonzentrationen steigen geringfügig nach 2-wöchiger Expositionszeit mit der nominalen Expositionskonzentration an, was eine Zunahme der Belastungssituation anzeigt. Wesentlich stärker wurde diese Belastungssituationen durch die Modulationen der Phagozytoseaktivität angezeigt (siehe Kap. 3.3.1).

Bioakkumulation von NiCl₂

Im Gegensatz zur Quecksilberaufnahme durch das Methylquecksilberchlorid verläuft die Nickelaufnahme nicht linear (siehe Kap. 3.3.5). Die Gewebekonzentrationen für Nickel steigen im Expositionsverlauf an und fallen anschließend wieder ab, auch werden im Vergleich zum Methylquecksilberchlorid wesentlich geringere Bioakkumulationsfaktoren erreicht (siehe Abb. 120 und Abb. 121). Die Ergebnisse lassen auf eine geringere Aufnahme und bzw. oder auf effiziente Ausscheidungsmechanismen für das Nickeldichlorid schließen, da bei der höchsten Expositionskonzentration kaum messbare Bioakkumulation nach 7 Tagen zu messen war. Wahrscheinlich bedingen Schwellenwertkonzentration sowie eine bestimmte Expositionsdauer die Aktivität der Entgiftungsmechanismen, was die hohen Bioakkumulationen bei niedrigen Konzentrationen erklärt. Das bioakkumulative Potenzial vom Nickeldichlorid ist jedoch gegenüber dem Methylquecksilberchlorid als wesentlich geringer zu bewerten. Die Bioakkumulationsergebnisse eignen sich auch nicht, um Aussagen über das immunmodulierende Potenzial treffen zu können. NiCl₂ akkumuliert in der höchsten Konzentration nach 7 Tagen kaum, zeigt aber hoch signifikante Hemmwirkung auf die Phagozytoseleistung (siehe Abb. 111 in Kap. 3.3.2). Der immunologische Belastungszustand ist nicht am bioakkumulativen Verhalten der Testorganismen für Referenzsubstanzen zu bestimmen.

In vivo-Expositionen von Entenmuscheln wurden mit Schwermetallverbindungen als Referenzsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlichen Expositionsintervallen durchgeführt. Dabei traten charakteristische Antwortmuster in der Phagozytoseaktivität der Versuchstiere auf, die immunmodulative Wirkungen anzeigten. Ob die Expositionsbedingungen sich auch für Umweltprobenversuchen, z.B. an unterschiedlich belasteten kommunalen und industriellenAbwasserproben eignen, um Immunodulationen an mehreren Messparametern anzuzeigen, sollte ein Folgeversuch klären.

4.3.2 In vivo-Versuche mit Abwasserproben

Die Inhaltsstoffe von Umweltproben sind meist vielfältig in ihrer Zusammensetzung und in ihren Wirkrichtungen (siehe Abb. 2 in Kap. 1.1.3). Mit biologischen Testverfahren können sowohl ökotoxikologische Wirkungen von Einzelstoffen als auch Kombinationswirkungen (agonistische, antagonistische, additive, synergistische, inhibitorische, kompetitive, usw.) aller vorhandenen Kontaminanten erfasst werden. Diese integrale Erfassung von Schadstoffwirkungen macht die ökotoxikologische Untersuchung als Entscheidungshilfe für ein Umweltmanagment unentbehrlich [3] und erweitert den chemisch-numerischen Ansatz zur Erfassung von Belastungen (siehe Kap. 1.1.2). Dass kommunale Abwasserproben immunto-xische Effekte auf limnische Muscheln besitzen können, wurde in [95] [19] an *Elliptio complanata* nachgewiesen. Niedrige Konzentartionen führten zu einer Stimulation der Phagozytoseaktivität, höhere Konzentrationen verursachten eine Hemmung der Phagozytoseaktivität (biphasische Antwort). Eine vollständige Bewertung des immuntoxischen Potenzials von Schadstoffen sollte durch die Verwendung von zellulären und humoralen Parametern der Immunfunktion erfolgen [36], da diese unterschiedlich in ihrer Antwortrichtung und Empfindlichkeit sein können.

Aus diesen Gründen wurden unterschiedlich belastete kommunale und industrielle Abwasserproben in ihrer "allgemeintoxischen Wirkung" und in ihrer immuntoxischen Wirkung mit einem multiparametrischen Ansatz getestet. Die allgemeintoxische Wirkung wurde zunächst mit einer limnischen Biotestpalette, bestehend aus Algen-, Daphnien- und Leuchtbakterientest (siehe Abb. 21 bis 24 in Kap. 2.3.3.4 und [111] [112] [113]) untersucht, die auch in der Abwasserabgabeverordnung [128] rechtlich verankert ist. Ausgehend von den Verdünnungsstufen der Abwasserproben, in denen kein toxischer Effekt mehr nachzuweisen war, wurden Muschelexpositionen durchgeführt und die Immunparameter der Phagozytoseaktivität (PL (GE), PA, PL (PE)), der ROS-Produktion, der vitalen Hämozytendichte und nekrotische Zellanteile erfasst. Diese Vorgehensweise sollte einen Vergleich ermöglichen, ob allgemeintoxische Potenziale und immuntoxische Potenziale verschiedener Abwasserproben in getrennten Konzentrationsbereichen erfasst werden können. Zwei Abwasserprobenpaare aus Zu- und Ablauf einer kommunalen und einer industriellen Kläranlage eines metallverarbeitenden Industriebetriebes wurden vom LANUV-NRW für Versuche zur Verfügung gestellt (siehe Kap. 2.3.3.4). Das kommunale Abwasser wurde zusätzlich mit einer Konzentration von ca. 5,75 mg/l Carbamazipin dotiert, im Ablauf befanden sich ca. noch 3,45 mg/l. Die Proben stammten aus einer Versuchskläranlage in Neuss. Bei den industriellen Abwasserproben handelte es sich um stark schwermetallhaltige Abwässer einer industriellen Kläranlage eines metallverarbeitenden Industriebetriebes in Nordrhein-Westfalen.

4.3.2.1 Biotestergebnisse der limnischen Biotestpalette

Die kommunalen Abwasserproben zeigten nur im Zulauf Effekte bis zu einer Verdünnungsstufe von 1 zu 2 mit dem Leuchtbakterientest an. In beiden industriellen Abwasserproben konnten toxische Effekte bis zu einer Verdünnungsstufe von 1 zu 16 gefunden werden (siehe Abb. 123 in Kap. 3.4.1). Die empfindlichsten Testorganismen für die industriellen Abwasserproben waren die Algen. Auffällig waren die hohen Leitfähigkeiten der industriellen Abwässer (siehe Tab. 7 in Kap. 2.3.3.4), die sich durch Behandlungsschritte mit Säuren und Laugen der Metall verarbeitenden Industrie ergaben, aber dennoch mit der limnischen Biotestpalette untersucht wurden, da es sich um allgemeintoxische Potenziale für ein limnisches Bezugssystem handelt. Die ermittelten toxischen Effekte setzten sich daher aus Salinitätsund Schadstoffwirkung zusammen. Generell waren die toxischen Effekte im Zulauf stärker als im Ablauf. Ausgehend von den pT-Werten [114] des sensitivsten Testorganismus wurden die Abwasserprobenpaare des kommunalen Abwassers sowie des industriellen Abwassers nochmals um den Faktor 2 für den Muschelexpositionsversuch mit deionisiertem Wasser verdünnt, neutralisiert und mit essentiellen Ionen aufgesalzen. Die kommunalen Abwasserproben wurden in einer Verdünnungsstufe von 1 zu 8 und die industriellen Abwasserproben in einer Verdünnungsstufe 1 zu 64 im Muschelexpositionsversuch eingesetzt. Der pT-Wert eignete sich in besonderem Maße, um das toxische Potenzial der Proben abzubilden.

4.3.2.2 Immunmodulierende Effekte der *In vivo*-Abwasserversuche mit *Anodonta anatina*

Die 4 Abwasserprobenverdünnungen sowie eine Positivkontrolle mit 1,1 mg/l Nickeldichlorid und die entsprechende Negativkontrolle wurden mit jeweils 6 Entenmuscheln über eine Expositionszeit von 2 Wochen mit täglichem Wasserwechsel getestet. 6 Messparameter wurden nach den Expositionen mit den Hämolymphen der exponierten Versuchstiere erfasst. Die Positivkontrolle hatte signifikanten Einfluss auf alle gemessenen funktionellen Immunparameter (ROS, PL(GE), PA und PL(PE)), aber keinen signifikanten Einfluss auf die vitale Hämozytendichte nach der Punktion sowie dem nekrotischen Anteil nach dem Phagozytoseansatz (siehe Abb. 154).



Abb. 154: Darstellung der erfassten Messparameter nach der Muschelexposition mit den Abwasserproben. Die Signifikanzniveaus wurden nach Mann-Whitney-U-Test Auswertung der Einzelwerte gegenüber der Negativkontrolle ermittelt. Das Signifikanzniveau von 1 entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit \leq 5%, 2 entspricht $\alpha \leq$ 1% und 3 entspricht $\alpha \leq$ 0,1%.

Alle anderen untersuchten Proben hatten ebenfalls keine signifikanten Einflüsse auf die Vitalität der Hämozyten. Jeweils eine von 6 Anodonten verstarb im Zu- und Ablauf des verdünnten industriellen Abwassers, was eventuell auch auf eine Restsalinität zurückzuführen ist (siehe Tab. 7 in Kap. 2.3.3.4). Doch weist die hohe Überlebensquote von 34 von 36 exponierten Muscheln auf überwiegend subletale Wirkungen. Der Zulauf der industriellen Kläranalage zeigte in 2 Phagozytoseparametern und dem ROS-Parameter immunmodulierende Effekte. Hingegen wies der Ablauf der industriellen Kläranlage nur bei der ROS-Produktion eine signifikante Stimulation auf, doch blieb er aber bei den Phagozytoseparametern unauffällig. Der Zulauf der kommunalen Kläranlage hatte im Phagozytoseanteil und in der ROS-Produktion eine signifikante stimulierende Wirkung, nicht aber in den Phagozytoseleistungsparametern. Dies zeigt möglicherweise die Notwendigkeit, die Phagozytoseaktivtät unter Belastungssituationen doch mit mehreren Immunparametern zu erfassen, da die Phagozytoseleistung (GE) rechnerisch zwar den Phagozytoseanteil integriert, aber an dieser Stelle keine signifikante Veränderung anzeigte.

In dem Abwasserversuch mit dem Ablauf der kommunalen Kläranlage waren keine immunmodulierenden Wirkungen nachzuweisen. Die aus den Expositionsszenarien ermittelten Versuchsbedingungen ließen sich auf belastete Abwasserproben mit allen Messparametern übertragen. Die Zwischenergebnisse der statistischen Auswertung mit dem Mann Whitney-U-Test sind Tab. 20 aus Kap. 6.1.1 zu entnehmen.

Insgesamt ließen sich immunmodulierende Effekte in 3 von 4 Abwasserproben in Verdünnungsstufen ableiten, in denen mit den Testsystemen der allgemeinen Ökotoxikologie keine Effekte mehr angezeigt werden konnten (siehe Abb. 123 in Kap. 3.4.1). Die Ergebnisse der Muschelexposition zeigten neben einer zusätzlichen Wirkrichtung der Immunmodulation gegenüber den klassischen Endpunkten der Ökotoxikologie aus der limnischen Biotestpalettte der BfG auch eine höhere Empfindlichkeit. Mit den Messparametern für Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion kann aber auch durch die Messung subletaler subchronischer immunmodulierender Effekte ein Stresspotenzial für das Immunsystem identifiziert werden, dessen ökotoxikologische Bedeutung und Funktion noch erfasst und bewertet werden sollte. Da ein weiterer Immunparameter (ROS-Produktion) in die Abwasserbewertung aufgenommen wurde, der zuvor in den Referenzsubstanzexpositionen nicht zum Einsatz kam, soll dieser gesondert diskutiert werden.

Messung der ROS-Produktion in vivo nach erfolgter Abwasserexposition

Für die *In vivo*-Versuche mit Abwasserproben wurde ein noch kürzeres Zeitintervall von nur 90 min Radikalsummenproduktion gewählt, um eine möglichst geringe Interferenz der Immunparameter extrazelluläre ROS-Produktion und der intrazellulären Phagozytoseaktivität zu messen. Es kam bei den I*n vivo*-Versuchen zu einer kontinuierlichen Oxidation des Phenolrots, pH-Wert Schwankungen, wie sie sich unter dem Schwermetalleinfluss *in vitro* zeigten, (siehe Abb. 30 in Kap. 2.3.7.4) blieben aus. Die Radikalproduktion der Sauerstoffspezies konnte kontinuierlich bestimmt werden. Auch zeigte die Anwendung der Phenolrotmethode auf *in vivo* exponierte Entenmuscheln mit verdünnten Abwasserproben ähnlich hohe Sensitivitäten wie die Phagozytoseaktivität. Im Gegensatz zu den gemessenen Phagozytoseaktivitäten wurden mit der Phenolrotmethode überwiegend stimulierende Effekte in den Abwasserproben angezeigt (siehe Abb. 133 in Kap. 3.4.2). Die direkte Antwortmöglichkeit in den ersten 90 min nach der Entnahme ergänzt die längere 20 h Messung der Phagozytoseaktivität als einen weiteren funktionellen Immunparameter.

Die Methode zeigte mit einem prozentualen interindividuellen Variationskoeffizient von über 40% bei 6 Individuen ähnlich hohe Schwankungen wie der Messparameter Phagozytoseleistung bezogen auf die Gesamthämozytenzahl, wobei die relativen Fehler beider Methoden im Vierfachansatz mit zwischen 5 und 11% vergleichsweise geringen Anteil haben (siehe Abb.157 in Kap.4.3.2.5).

Insgesamt wurden 6 Bedingungen getestet, wovon unter 4 Bedingungen immunmodulierende Potenziale gemessen wurden (siehe Abb. 154). In 3 von 4 Fällen wurden gemeinsame Modulationen der Phagozytoseaktivität und der ROS-Produktion gemessen, was trotz der Unterschiedlichkeit der Antwortrichtung und Antwortzeit der Hämozyten auf Belastungspotenziale hinweist, die mehrere Funktionsparameter zu ändern vermögen. Die Abwasseruntersuchungen zeigen, dass die Belastungspotenziale aber nicht ausschließlich durch die Wahl eines Immunparameters angezeigt werden können. Der multifaktorielle Ansatz einer Bewertung der Immunantwort ist daher bei zukünftigen Abwasserbewertungen vorzuziehen.

4.3.2.3 Fazit des Muschelexpositionsversuchs

Alle 4 funktionellen Immunparameter wurden durch die Positivkontrolle verändert, was die Funktionalität des Ansatzes, bzw. eine wiederholt induzierbare Immunmodulation durch Nickeldichlorid, unterstreicht.

- In den Zuläufen wurden jeweils größere immunmodulierende Potenziale gefunden als in den entsprechenden Abläufen.
- Das industrielle Abwasser zeigte f
 ür den Zu- und Ablauf gr
 ößere Immunmodulation als das entsprechende kommunale Abwasser, was trotz der unterschiedlichen Verd
 ünnungsstufen von 1 zu 8 gegen
 über 1 zu 64 die hohe Belastungsqualit
 ät der industriellen Abwasserproben anzeigt.
- Durch die Verwendung mehrerer funktioneller Immunparameter lässt sich das immunmodulierende Potenzial auch in Verdünnungsstufen klassifizieren und vergleichen, in denen keine allgemeintoxischen Effekte zu bestimmen sind.



Abb. 155: Immunmodulierendes Potenzial der verdünnten Abwasserproben

Auch andere Studien belegen Abwassereinflüsse auf mehrere Immunparameter [95]. Durch multifaktorielle Ansätze kann die ökotoxikologische Relevanz von Untersuchungsergebnissen detaillierter abgebildet werden und erlaubt Bewertungen chemischer Belastungssituationen [22].

4.3.2.4 Regeneration der Immunparameter nach erfolgter Exposition

Die Entenmuscheln der Versuchsbedingungen mit den stärksten immunmodulierenden Effekten (Zulauf ind. Abwasser und Positivkontrolle) wurden nach der Punktion für 3 Wochen in die Laborhälterung übernommen. Anschließend wurden die Messparameter der Abwasserexposition erneut bestimmt. Da unter unbelasteten Bedingungen die Muscheln nach einem Punktionsintervall von 3 Wochen die Messparameter für vitale Hämozytendichte und Phagozytoseaktivität (siehe Kap. 3.1.4.4) vollständig regeneriert sind, wurde durch diesen Versuchsansatz das Erholungspotenzial der Versuchstiere unter Expositionsbedingungen getestet. Zusätzlich erlaubte dieser Versuchsansatz Erkenntnisse über die Dauer der Wirkungen aus dem Expositionsversuch.

Die Entenmuscheln konnten sich nach einer zweiwöchigen Exposition mit dem Zulauf der industriellen Kläranlage und der Positivkontrolle (1,1 mg/l NiCl₂) von einer signifikanten Reduktion in den gemessenen funktionellen Phagozytoseparametern (PL (PE), PA und PL (GE)) nicht nur erholen, sondern zeigten auch eine Steigerung gegenüber dem Phagozytoseleistungslevel der Negativkontrollen nach der Exposition (Abb. 156). Die Steigerungstendenz bei den Phagozytoseparametern ist sowohl bei den Muscheln der Abwasserexposition (die Steigerung beträgt mehr als 45% gegenüber dem Expositionslevel und mehr als 20% gegenüber der NK), als auch bei den Versuchstieren nach der Referenzsubstanzexposition zu erkennen (die Steigerung beträgt mehr als 60% gegenüber dem Expositionslevel und mehr als 30% gegenüber der NK).



Abb. 156: Prozentuale relative Veränderung der mittleren Phagozytosemessparameter nach der Expositionsphase und anschließender Regenerationsphase, bezogen auf die Negativkontrolle nach der Exposition. Der mittlere prozentuale interindividuelle Vk pro Ansatz beträgt 33%.

Die Steigerung ist statistisch nur signifikant bei den Muscheln der Referenzsubstanzexposition für die Phagozytoseleistungsparameter (siehe Tab. 21 in Kap. 6.1.2). Die Produktion an ROS hat sich nach der Regenerationsphase auf das Niveau der Negativkontrollen gesenkt, was auf eine Regeneration des "Oxidative Burst" deutet (siehe Abb. 133 in Kap. 3.4.2). Leider konnten die Versuchstiere aus der Negativkontrolle nicht nach der Regenerationsphase getestet werden, so dass sich der Vergleich nur auf die Level der Funktionsparameter nach der Exposition an den gleichen Individuen stützt.

Eine immunmodulatorische Stimulation der Phagozytoseaktivität als verspätete Stressantwort nach der Exposition und anschließender Regenerationsphase kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, wie in Abb. 154 dargestellt ist. Ähnliche Effekte wurden auch bei geringeren Expositionsintervallen und Referenzsubstanzkonzentrationen als sogenannte "Stressaktivierung" mit Referenzsubstanzen (Nickeldichlorid und Methylquecksilberchlorid in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) beobachtet. Sowohl mit den Expositionsversuchen mit Referenzsubstanzen als auch mit den verdünnten Abwasserproben ließen sich trotz interindividueller Schwankungen immunmodulierende Potenziale ableiten. Die Immunmodulationen normalisierten sich nur teilweise und zeigten 3 Wochen nach der Exposition noch Abweichungen von den Negativkontrollen aus dem Expositionsversuch. *In vivo*-Expositionsszenarien mit Entenmuscheln eignen sich, um subletale subchronische immunmodulierende Potenziale anhand mehrerer Messparameter anzuzeigen.

Sollten sich diese Befunde nach weiteren Expositionsversuchen bestätigen lassen, so wäre ein über die Expositionszeit andauerndes immuntoxisches Potenzial nachgewiesen und es wäre zu klären, wann eine vollständige Regeneration der Immunparameter nach Belastungssituationen stattfindet. In der Umwelt sind Muscheln dauerhaft geringen Konzentrationen von Xenobiotika ausgesetzt, so dass Regenerationsintervalle aus Laborversuchennur bedingt auf Freilandexpositionen übertragbar sind. Zusätzlich können in der Umwelt auch stoßweise Belastungen toxikologische Konsequenzen bewirken, deren Wirkungen zur Zeit nur mit Modellen abgeschätzt werden können. Die ersten Ergebnisse dieser Regenerationsversuche geben jedoch Anhaltspunkte, dass ein immunmodulatorisches Potenzial eine über mehrere Wochen nach der Belastungsituation anhaltende Wirkung auf die Phagozytosaktivität von Muscheln ausüben kann und eine Störung des Immunstatus darstellt (siehe Abb. 3 in Kap. 1.2.1).

4.3.2.5 Fehlerdiskussion der Abwasserversuche

Auffallend sind die hohen interindividuellen Schwankungen gegenüber den individuellen Messfehlern im Vierfachansatz für die untersuchten Messparameter, was zwar die Qualität der Methoden, aber auch die interindividuelle Variabilität der Entenmuscheln in den verwendeten Messparametern zeigt (siehe Abb. 157).



Abb. 157: Variationskoeffizienten der Messparameter im Abwasserexpositionsansatz

Der Phagozytoseanteil besitzt die geringsten individuellen und interindividuellen Variationskoeffizienten, doch zeigt der Messparameter auch nur einen schmalen Antwortbereich, so dass er alleinig nicht Modulationen der Phagozytoseaktivität anzeigen kann. Trotz einer dreiwöchigen Vorhälterung der Versuchstiere im Labor ist es möglich, dass andere biometri-
sche Faktoren sowie unterschiedliche Altersklassen im Testansatz das Expositionsverhalten beeinflusst haben.

Weitere Standardisierungsmaßnahmen, z.B. bezüglich der Temperatur oder der Individuenauswahl in der Labor- und Expositionshälterung können ebenfalls interindividuelle Variabilitäten reduzieren.

Die Mann-Whitney-U-Testergebnisse (siehe Tab. 20 in Kap. 6.1.1) der statistischen Auswertung mit den der Daten aus der Abwasserexpositionen zeigt die gute Klassifizierbarkeit der immunmodulierenden Potenziale durch die Verwendung mehrerer Messparameter. Auch die relativ geringe Anzahl von 36 Individuen für 6 Bedingungen reichte zwar für eine Abbildung immunmodulierender Potenziale aus, die jedoch sicherlich durch einen erhöhten Versuchtiereinsatz verbessert werden könnte.

4.3.3 Statistik der Expositionsmessparameter

Es musste ein Verfahren ausgesucht und angewendet werden, das sowohl mit den biologischen Variabilitäten der Versuchstiere als auch mit unterschiedlichen Verteilungsformen der Messergbnisse der verschiedenen Messparameter operieren kann. Alle erhobenen Messdaten aus den Expositionversuchen wurden mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test gegenüber den Negativkontrollen getestet. Das Testverfahren ist das verteilungsunabhängige Gegenstück zum parametrischen t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte stetiger Verteilungsfunktionen [115]. Voraussetzungen für den U-Test sind zumindest ordinal skalierte Zahlenwerte (Ränge) und eine ähnliche bis gleiche Verteilungsform. Der U-Test reagiert auf Unterschiede der Rangsummen von unabhängigen Stichproben. Dazu mussten die Einzelmesswerte aus den Mehrfachbestimmungen der Individuen mit verwendet werden. Dieses Verfahren birgt die Gefahr einer statistischen Überinterpretation der Messwerte, doch hätten sonst aufgrund der interindividuellen Schwankungsbreite der Messparameter und aus Praktikabilitätsgründen keine immunmodulierenden Potenziale abgeleitet werden können. Eine Erhöhung der Individuenzahl um das Vierfache, um eine vergleichbare Datenbasis aus Mittelwerten zu erhalten, hätte dazu geführt, dass statt 128 Muscheln in den Referenzsubstanzexpositionen (für 8 Bedingungen mit je 4 Zeitintervallen) 512 Muscheln eingesetzt werden müssen und statt 36 Muscheln (6 Bedingungen) in den Abwasserversuchen 144 Muscheln und dessen Vertretbarkeit unter Tierschutzaspekten nachteilig beeinflusst. Da mir nur 36 Expositionsplätze parallel für jeweils 2 Wochen zur Verfügung standen, hätte sich die Gesamtversuchsdauer ebenfalls vervielfacht. Aus den Ergebnissen der Abwasserexpositionen kann jedoch geschlossen werden, dass eine Probenbewertung mit jeweils 10 Individuen für eine Ableitung starker immunmodulierender Potenziale zwischen den Individuen möglich sein sollte und wird für folgende Untersuchungen empfohlen.

4.4 In vivo-Frei(land)exposition mit Muscheln

Bei anderen Muschelarten wurden Einflüsse von Geschlecht, Fortpflanzungsperiode und Wassertemperatur auf die Phagozytoseaktivität berichtet [76] [47] [48] [19] [49]. So wurden in Laborversuchen mit *Mytilus edulis*, bei einer Temperaturerhöhung von 10 auf 15 °C, eine Aktivierung der Phagozytoseaktivität, aber eine Hemmung der ROS-Produktion nachgewiesen [76]. In der temperatursensitiven *Chamelea gallina* führte eine Temperaturerhöhung von 20 auf 30 °C zu einem Rückgang der Phagozytoseaktivität aber zu einem Anstieg in der Hämozytendichte [47]

In Freilandhälterungen wurden bei *Mytilus edulis* im Hochsommer signifikante Reduzierungen der Phagozytoseaktivität beobachtet, die mit dem Schwärmverhalten der Muscheln in Zusammenhang gebracht werden können [48]. Auch bei *Elliptio complanata* wurde von jahreszeitlichen Schwankungen der Phagozytoseaktivität, besonders in den Sommermonaten berichtet [19]. Bei Austern (*Crassostrea gigas*) wurde ein Rückgang der Phagozytoseaktivität und Hämozytenvitalität in den Sommermonaten Juni bis August beschrieben, der mit dem Schwärmverhalten korreliert [49]. Zusätzlich wird ein Einfluss von Geschlecht und endogenem Status diskutiert.

Insgesamt kommt es also in Freilandhälterungen zu saisonalen Schwankungen der Immunfunktionen in Muscheln. Das Immunsystem steht dabei im Mittelpunkt einer Reihe von Faktoren (confounding factors oder Störfaktoren), die Immunantworten modulieren können und eine direkte Zuordnung der Immunantwort zu Umweltbelastungen erschweren (Abb. 158).



Abb. 158: Einflussgrößen auf das Immunsystem, verändert nach [75].

Trotz der Variabilität dieser Faktoren und Einflussmöglichkeiten wird die Phagozytose als einer unter mehreren Immunparametern bewertet, der Aussagen über Umweltbelastungen an Expositionsstandorten erlaubt [50] [19] und eine Schlüsselrolle für den Nachweis immuntoxischer Potenziale besitzt. Ob dieses auch im Freiland für Entenmuscheln zutrifft, sollte die Erfassung der Immunparameter für Phagozytoseaktivität und der vitalen Hämozytendichten in der Rheinwasserhälterung im Jahresgang 2006 beantworten (siehe Kap. 4.4.1). Zusätzlich fand ein Vergleich zwischen den Immunparametern der Labor- und Rheinwasserhälterung statt (siehe Kap. 4.4.3).

4.4.1 Schwankungen der Immunparameter im Jahresgang

Zu 29 Messzeitpunkten im Jahr 2006 wurden jeweils 6 Individuen punktiert und die Immunparameter der vitalen Hämozytendichte und der Phagozytoseaktivität untersucht (siehe Kap. 3.5.2). Die Messparameter der Phagozytoseaktivität (Phagozytoseanteil und Phagozytoseleistung (GE)) und der vitalen Hämozytendichte weisen neben den hohen interindivuellen Schwankungen für 6 Individuen saisonale Rhythmen auf. Es kommt während des Untersungszeitraumes zu zahlreichen lokalen Anstiegs-und Abklingphasen (siehe Abb. 140 und 141 in Kap. 3.5.2). In den KW 24-30 steigt die Hämozytendichte und in den KW 18 bis 27 die Phagozytoseaktivität an, doch reduzieren sich beide Immunparameter anschließend. Besonders in den späten Sommermonaten (Mitte August und September, siehe Abb. 139) bricht die vitale Hämozytendichte ein. Einige Wochen später kommt es auch zu einer Reduzierung der Phagozytoseaktivität (siehe KW 39 in Abb. 140). Die Saisonalität dieser Schwankungen wurde im Kapitel 3.5.3 durch Korrelationsanalysen gestützt, doch sollte erwähnt werden, dass der Anteil an interindividuellen Schwankungen in den Messparametern der Rheinwasserhälterung bei nur 6 Individuen pro Messintervall recht hoch ist und einen saisonalen Verlauf verzerren kann.

4.4.2 Saisonale Korrelationen der Immunparameter in der Rheinwasserhälterung

Es wurde ein saisonaler Verlauf für den Jahresgang 2006 mit einem Ausschnitt an erfassbaren biotischen und abiotischen Faktoren untersucht. Ob ein weiterer Jahresverlauf ähnliche Korrelationen aufweist, bleibt zu überprüfen. Doch konnten mehrere formale Korrelationen in einzelnen Temperaturverläufen gefunden werden (siehe Abb. 159).



Abb. 159: Korrelationsergebnisse für unterschiedliche Temperaturbereiche der Rheinwasserhälterung. Alle formalen Korrelationen konnten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% angenommen werden. Akürzungen: T= Temperatur, HD= vitale Hämozytendichte, PL(GE) = Phagozytoseleistung der gesamten Hämozyten

Dennoch sollten daraus keine kausalen Korrelationen abgeleitet werden, da es eine Reihe nicht erfasster temperaturabhängiger Faktoren gibt, die ebenfalls Einfluss auf die Immunparameter genommen haben könnten wie der Pathogeneinfluss oder das Schwärmverhalten der Muscheln. Auch kann die Wasserqualität, z.B. durch unterschiedliche Schwebstoffanteile und chemische Parameter variieren und die Sensitivität der Muscheln für diese Faktoren ebenfalls temperaturbeeinflusst sein [76]. Die gefundenen formalen Korrelationen geben jedoch Aufschluss, dass die Temperatur für die Messparameter der Phagozytoseaktivität und der vitalen Hämozytendichte direkt oder indirekt beeinflusst und im ansteigenden Temperaturbereich die Immunparameter auch untereinander korrelieren können. Die Phagozytoseaktivität und die vitale Hämozytendichte von im Rheinwasser exponierten Entenmuscheln unterliegt saisonalen Schwankungen, die in Zusammenhang mit Umweltfaktoren gebracht werden können. Auch der ermittelte Einfluss von Hälterungs-und Versuchstemperaturen auf die Phagozytosekinetik von Hämozyten und Entenmuscheln (siehe Kapitel 3.1.6.5 bis 3.1.6.7) legt eine direkte Abhängigkeit zur Temperatur nahe und erklärt zumindest die gefundenen Korrelationen im ansteigenden Temperaturbereich. Die regulativen Mechanismen der Immunparameter können aus den erfassten Daten nicht bestimmt werden.

Da sich die Korrelationen in dem "extremen" Temperaturbereich auflösen, ist anzunehmen, dass diese regulativen Mechanismen nur innerhalb eines bestimmten Bedingungsbereichs wirksam sind. Ab einer bestimmten Temperaturschwelle bricht der korrelative Zusammenhang zusammen und benötigt längere Zeit, sich teilweise erneut zu etablieren. Die Einbruchphasen der Immunparameter in den späten Sommermonaten werden, z.B. auch in [48] und [49] für andere Muscheln beschrieben. Ob die Abnahme der Immunparameter durch ein Schwärmverhalten der Muscheln ausgelöst wurde bleibt ungeklärt.

Die gemessenen interindividuellen Schwankungen und saisonalen Rhythmen zeigen, dass eine Einschätzung immunmodulierender Potenziale im Freiland mit Entenmuscheln wesentlich komplexer als in einer Laborhälterung ist. *In vivo*-Expositionen von Entenmuscheln im Freiland können in der Regel keine immunmodulierenden Potenziale anzeigen. Nur in Fällen einer extremen Modulation der Phagozytoseaktivität und der vitalen Hämozytendichte kann bei den gezeigten Schwankungsbreiten im Freiland ein immuntoxisches Potenzial ermittelt werden und dies auch nur bei einem hohen Einsatz an Versuchstieren. Als problematisch erweist sich auch der Einsatz von Kontrollgruppen in Freilanduntersuchungen, da lokale Beeinflussungen schwer abzuschätzen sind.

4.4.3 Vergleich von Immunparametern zwischen Labor- und Rheinwasserhälterung

Vergleich der Phagozytoseleistung

Im Vergleich wurden 21 Phagozytoseleistungen von Entenmuscheln aus der Laborhälterung den 174 Messungen der Rheinwasserhälterung gegenübergestellt (siehe Kap. 3.5.4) und mit dem Mann Witney-U-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Phagozytoseleistungsniveau gefunden werden, die mittleren Phagozytoseleistungen liegen zwischen 9 und 10 Beads pro Hämozyt unter beiden Hälterungsbedingungen. Auffallend ist eine Varianzungleichheit zwischen den Hälterungs-bedingungen. Während der mittlere prozentuale interindividuelle Vk der Phagozytoseleistungen aus der Rheinwasserhälterung bei 50% liegt, ergibt sich in der Laborhälterung ein Wert von 22%. Die methodischen Fehler der Dreifachbestimmung liegen zwischen 10 und 13% und nehmen einen vergleichsweise geringen Anteil an den gezeigten Schwankungen ein. Der größte Anteil wird vermutlich durch interindividuelle Schwankungen und saisonale Einflussgrößen in der Rheinwasserhälterung verursacht. Modulationen der Phagozytoseleistungen können daher wesentlich besser unter Laborbedingungen erfasst werden, da der Antwortbereich enger ausfällt und weniger stark durch "confounding factors oder Störfaktoren" beeinflusst wird (siehe Abb. 158 in Kap. 4.4). Auch zeigen die in vivo-Versuche mit Referenzsubstanzen und Abwasserproben unter Laborbedingungen, dass signifikante Modulationen der Phagozytoseleistung ausgelöst werden können (siehe Kap. 3.3.1, 3.3.2 und 3.4.2). Die Laborhälterung ist gegenüber der Rheinwasserhälterung bei einer Erfassung immunmodulierender Potenziale auf die Phagozytoseaktivität zu bevorzugen.

Vergleich der vitalen Hämozytendichten

Im Vergleich wurden 74 vitale Hämozytendichten von Entenmuscheln der Laborhälterung den 174 Messungen der Rheinwasserhälterung gegenübergestellt (siehe Kap. 3.5.4) und mit dem Mann Witney-U-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Der Vergleich zwischen beiden Hälterungsbedingungen zeigte, dass auch das Niveau der mittleren vitalen Hämozytendichten in Rheinwasser- und Laborhälterung ähnlich ist, aber gleichsam enormen Schwankungen unterliegt (Vk der Laborhälterung = 48%, Vk der Rheinwasserhälterung = 50%). Ein Teil dieser Schwankungen kann durch die Punktionsfolgen erklärt werden, die mit der Hämolymphgewinnung einhergeht (siehe Kap. 3.1.4), da für die Datengenerierung Mehrfachpunktionen notwendig waren. Eine Regeneration der vitalen Hämozytendichte konnte für zweimalige Punktionen nachgewiesen werden, bisher aber nicht für höhere Anzahlen an Punktionen (siehe Kap. 3.1.4.4). Allerdings treten hohe Schwankungen der Hämozytendichte auch in den In vivo-Abwasserversuchen auf (siehe Kapitel 3.4.2), in denen nur eine einmalige Punktion erfolgte (der mittlere Vk für 6 Individuen beträgt dort 33%). Signifikante Modulationen der vitalen Hämozytendichte konnten aufgrund der geringen Datendichten und der hohen Schwankungen auch in den Abwasserexpositionen nicht ermittelt werden. Da saisonale temperaturbedingte Einflüsse auf die vitalen Hämozytendichten in der Rheinwasserhälterung durch formale Korrelationen nachgewiesen werden konnten (siehe Kapitel 4.4.2), ist die Laborexposition als Teststrategie für eine Erfassung immunmodulierender Effekte vorzuziehen.

4.4.4 Punktionsfolgen

Obwohl die Punktion des vorderen Schließmuskels zur Hämolymphentnahme als relativ nicht-invasive und nicht-letale Technik an Süßwassermuscheln evaluiert wurde [122], kam es nach mehrmaligen Punktionen zu erheblichen Degenerationserscheinungen am vorderen Schließmuskelgewebe der Entenmuscheln in Rheinwasser- und Laborhälterung (siehe Kap. 3.1.4.1). Alternative Entnahmetechnicken an verschiedenen Muschelarten werden, z.B. in [30] beschrieben. Doch wurden andere Entnahmetechniken aus dem Herz oder aus dem hinteren Schließmuskel nicht erprobt, da diese einen wesentlich stärkeren Eingriff für die Tiere bedeuten und eine mehrmalige Punktionsmöglichkeit angestrebt wurde.

Plattierungsversuche zum Mikroorganismeneintrag während der Punktion erhärteten die These (siehe Kap. 3.1.4.2), dass die ausgeprägten Degenerationserscheinungen der Schließmuskeln nicht mit einer alleinigen mechanischen Schädigung zu erklären sind. Durch die Punktion kommt es zum Eintrag von Mikroorganismen und zur Entnahme der zu Immunabwehr befähigten Hämozyten. Neben dem Wundverschluss, sowie der Fixierung der Pathogene durch Adhäsionsverhalten der Hämozyten [25], kann auch weder Phagozytose noch eine ROS-Produktion um die Entnahmestelle stattfinden, bis weitere Hämozyten in die geschädigte Geweberegion eintreffen, um diese Aufgaben zu übernehmen. Andere wichtige Aufgaben der Hämolymphe als zirkulatorische Flüssigkeit in Muscheln, wie der Transport von Nährstoffen, Atmungsgasen, Enzymen, Stoffwechselprodukten und Giftstoffen werden durch die Entnahme der Hämolymphe für bestimmte Zeit unterbunden.

Mit zunehmender Degeneration des Schließmuskelgewebes in der Rheinwasserhälterung war die Mortalitätsrate in den Wintermonaten höher; besonders in den kälteren Monaten kam es häufig zu Ausfällen der Versuchstiere. Niedrige Temperaturen können sich sowohl nachteilig auf Regenerationsfähigkeit, aber auch auf die Phagozytoseaktivität (siehe Kap. 3.1.6.5) auswirken, was die Eliminierung von eingetragenen Pathogenen erschwert. Eine Versuchsgruppe von 43 Entenmuscheln wurde von KW 16 bis KW 52 im Jahr 2006 im Mittel 3,7mal unter Berücksichtigung der minimalen Regenerationsintervalle punktiert. 58% der Versuchstiere fielen in diesem Zeitraum für die Hämolymphgewinnung aus, und 47% waren nach der KW 52 verstorben. Es konnten Bedingungen in der Laborhälterung gefunden werden, die mehrmonatige Hälterungen von Entenmuscheln gewährleisten und auch besser vergleichbare Phagozytoseaktivitäten als in der Rheinwasserhälterung bewirkten (siehe Kap. 3.5.4). Die Muscheln in Laborhälterung ermöglichten je nach Größe 3-5 Punktionen. Möglichkeiten, die Punktionsfolgen zu minimieren, bestehen in einer Limitierung der Punktionsvolumina auf 0,5 bis 1 ml Hämolymphe je nach Gewicht und Größe der Muscheln und in einer Erhöhung der zeitlichen Abstände der Punktion. Die Untersuchungen zur Phagozytoseaktivität auf den unterschiedlichen Erfassungsebenen (siehe Abb. 153 in Kap. 4) belegen, dass ein kontinuierlicher Bedarf an Hämolymphe, wie zum Methodenaufbau, auch nicht gegeben ist, sondern dass die In vivo-Labor-Exposition mit einmaligen bis zweimaligen Punktionen ausreicht, um immunmodulierende Potenziale zu bestimmen. Damit kommt es zu einem erhöhtem Bedarf an Versuchstieren, aber die Punktionsfolgen werden minimiert.

4.5 Sensitivitätsvergleiche

Zusammenfassung

Es wurden die strukturellen Vitalitätsparameter der vitalen Hämozytendichte und des nekrotischen Anteils von Entenmuscheln mit den Vitalitätsparametern anderer Muschelarten verglichen. Dabei zeigten sich, neben den hohen interindividuellen Schwankungen, auch starke Variabilitäten zwischen verschiedenen Muschelarten. Die beiden Messparameter reagierten auch in den In vivo-Abwasserversuchen nicht auf Belastungspotenziale, bei denen die funktionellen Messparameter für Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion signifikant verändert wurden. Dennoch sollten sie für einen Nachweis starker zytotoxischer Belastungen weiterhin miterfasst werden, da die durchgeführten Abwasserversuche in subletalen Verdünnungsstufen durchgeführt wurden, in denen auch keine allgemeintoxischen Potenziale mit Algen-, Daphnien- und Leuchtbakterientest zu bestimmen waren. Für die verwendeten In vitro-Ansätze mit Muschelhämozyten aus Entenmuscheln konnte keine getrennte Erfassung von zytotoxischen und immuntoxischen Effekten erreicht werden.

Die Sensitivtätsmuster für die Wirkung verschiedener Schwermetalle auf die Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten aus Entenmuscheln und P388-Mausmakrophagen wurden verglichen. Es konnte trotz der phylogenetischen Distanz der verwendeten Zelltypen eine ähnliche Sensitivität mit einem vergleichbarem Muster bestimmt werden. Auch ein Literatur-Vergleich der EC₅₀-Werte unter der Wirkung von Methylquecksilberchlorid auf die In vitro-Phagozytoseaktivität von Blutzellen aus Entenmuscheln und verschiedener Säugerorganweist vergleichbare Hemmwirkungen auf. Die Mechanismen der Phagozytosehemmung scheinen in Säugerblutzellen und Muschelhämozyten ähnlich zu sein, was auf eine Konservierung der grundlegenden Immunfunktionen schließen lässt.

Die In vitro-Empfindlichkeit des Messparameters der Phagozytoseaktivität für die Schwermetallverbindung mit der geringsten (NiCl₂) und der stärksten Hemmwirkung (CH₃HgCl) auf die Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten wurde mit den In vivo-Nachweisgrenzen aus den Expositionsversuchen mit Entenmuscheln verglichen. Die In vivo-Expositionen von Entenmuscheln waren in der Lage, Hemmwirkungen auf die Phagozytoseaktivität für das NiCl₂ in einer 2300fach niedrigeren Konzentration und für das CH₃HgCl in einer 11000fach niedrigeren Konzentration anzuzeigen. Zusätzlich wurde der toxikologische Endpunkt für Mortalität aus der ökotoxikologischen Datenbank der US-EPA für Mollusken dargestellt. Dabei zeigte sich, dass Hemmwirkungen auf die Phagozytoseaktivität mit den verwendeten In vitro-Verfahren ausschließlich in letalen Konzentrationen für Mollusken zu erfassen sind, hingegen die In vivo-Exposition von Entenmuscheln in der Lage ist, in subletalen Konzentrationen immuntoxische Effekte anzuzeigen.

4.5.1 Vitalität von Muschelhämozyten *in vitro* und nach *In vivo*-Expositionen von Entenmuscheln

Die Vitalität der Hämozyten ist eine wichtige Voraussetzung für die Erfüllung von Immunfunktionen und kann frühe oder späte zytotoxische Effekte anzeigen. Daher werden Vitalitätsparameter häufig *in vitro* [35] [78] [19] [95] und nach *In vivo*-Expositionen von Muscheln [83] [51] [96] [19] parallel zu den Immunfunktionen bestimmt (siehe Tab. 3 in Kap. 1.2.5). Die häufigsten Vitalitätsbestimmungen erfolgten durch Trypanblaufärbung und PJ-Färbungen von Hämozyten und zeigen späte zytotoxische Effekte durch den Verlust der Membranintegrität an (siehe Kap. 2.4.1.1 und Kap. 2.4.6). Frühere zytotoxische Effekte können, z.B. durch den Messparameter der Esteraseaktivität von Hämozyten [19] angezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vitalität der Hämozyten zu zwei Zeitpunkten festgestellt, bei der Entnahme und nach dem Phagozytoseansatz. So wurden die mittleren vitalen Hämozytendichten der durch Punktion gewonnenen Hämolymphen durch eine Zählung in der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblaufärbung bestimmt. Im Anschluss an den Phagozytoseansatz standen zwei durchflusszytometrische Methoden mit den DNA Farbstoffen Sytox-Green und Propidiumjodid zur Verfügung, die nekrotische Zellanteile, also späte zytotoxische Effekte anzeigen konnten. Die durchflusszytometrischen Vitalitätsbestimmungen wurden *in vitro* und nach den *in vivo*-Expositionen von Entenmuscheln mit Referenzsubstanzen und Abwasserproben durchgeführt.

Vitale Hämozytendichten nach Trypanblaufärbung

Die vitale Hämozytendichte unterliegt sowohl in der Rheinwasserhälterung als auch in der Laborhälterung großen Schwankungen (siehe Kap. 3.5.4). Der Großteil wird durch interindividuelle Schwankungen verursacht, ein weiterer Anteil konnte mit dem ansteigenden und abfallenden Temperaturverlauf in der Rheinwasserhälterung in Zusammenhang gebracht werden (siehe Kap. 3.5.3). Eine mögliche Ursache für die Saisonalität der Schwankungen ist, dass Muscheln bei höheren Temperaturen auch erhöhter mikrobieller und pathogener Aktivität ausgesetzt sind, auf die sie mit einer Erhöhung der Anzahl ihrer verteidigungsfähigen Hämozyten reagieren müssen. In extremen Temperaturbereichen verliert sich dieser Zusammenhang. Generell ist aufgrund der Schwankungen eine Anwendbarkeit dieses Messparameters nur bei ausreichend hoher Individuenzahl denkbar. In den Abwasserversuchen konnten unter 6 Bedingungen mit 6 Individuen keine signifikanten Veränderungen der vitalen Hämozytendichte gefunden werden, obwohl in 4 von 6 Versuchsbedingungen immunmodulierende Potenziale nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 154 in Kap. 4.3.2.2).

Durchflusszytometrische Vitalitätsfärbungen

Die durchflusszytometrischen Vitalitätsfärbungen mit PJ und Sytox-Green wurden nach den Phagozytoseansätzen *in vitro* und nach *In vivo*-Expositionen von Entenmuscheln angewendet und konnten nekrotische Zellanteile anzeigen. Beide durchflusszytometrischen Methoden zeigten *In vitro* eine gute Übereinstimmung im Nachweis zytotoxischer Effekte von NiCl₂ (siehe Kap. 3.1.7). Der Auflösungsbereich fiel sehr gering aus und lag zwischen 7 und 27% Nekroseanteil. Die Hämozyten waren vermutlich in der Lage, während des 20-stündigen

Schüttelprozesses Trümmer- und nekrotische Zellanteile zu phagozytieren, womit der messbare Bereich begrenzt wurde.

Eine Zunahme der nekrotischen Zellanteile konnte in einem Konzentrationsbereich zwischen 10⁻⁵ und 10⁻³ mol/l an NiCl₂ bestimmt werden, hingegen kam es bei höheren Konzentrationen zu einem Rückgang der nekrotischen Zellanteile. Hohe Schwermetallkonzentrationen führten zur Denaturierung der Membranen, was eine Konservierung der Zellen bewirkt und nur geringe nekrotische Anteile anzeigt, obwohl die Zellen keine Vitalität mehr besitzen. Solche Effekte sind durch Schwermetallwirkung beschrieben, so kommt es unter Cadmiumeinfluss zum Rückgang von Memranpotenzialen an Muschelhämozyten [80]. Auch werden Quecksilberlösungen zu Inaktivierungen von biologischen Systemen benutzt, z.B. wenn der chemische Sauerstoffbedarf in Umweltproben bestimmt werden soll.

Bei den In vivo-Versuchen von Entenmuscheln mit Abwasserproben kam die Sytox-Green-Färbemethode zum Einsatz (siehe Abb. 127 in Kap. 3.4.2), doch konnten aufgrund der Schwankungen in der Negativkontrolle keine signifikant abweichenden nekrotischen Zellanteile bestimmt werden. Auch hier fiel der Auflösungsbereich sehr gering aus und lag zwischen 7 und 36% in den nekrotischen Zellanteilen. Generell lässt sich aus den Abwasseruntersuchungen ableiten (siehe Abb. 154 in Kap. 4.3.2.2), dass die funktionellen Immunparameter für Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion empfindlicher als die Vitalitätsparameter der vitalen Hämozytendichte und der nekrotischen Zellanteile reagierten. Da die Versuche in für die Organismen subletalen Konzentrationen und Verdünnungstufen durchgeführt wurden, kann dieses Ergebnis auch auf unterschiedliche Wirkungslevel für spezifische immmuntoxische und allgemeine zytotoxische Effekte zurückzuführen sein (siehe Abb. 2 Kap. 1.1.3), was im Sinne einer Erfassung von subchronischen immuntoxischen Effekten steht. Bei der Verwendung anderer Muschelarten wie der Sandklaffmuschel (Mya arenaria) [83] wurden bei in vivo-Versuchen mit Quecksilber- und Methylquecksilberchlorid zytotoxische Effekte mit der PJ-Methode bei Expositionskonzentrationen ab 10⁻⁶ mol/l, doch setzten bei dieser Konzentration auch erst hemmende Effekte auf die Phagozytoseaktivität ein. Eine getrennte Erfassung von zytotoxischen und immuntoxischen Effekten scheint nicht bei allen Muschelarten möglich zu sein. Dass Muschelhämozyten artspezifisch sehr unterschiedliche Vitalitätslevel nach PJ-Bestimmung in ihrem Hämolymphsystem haben können zeigt [78]. Die Anteile an vitalen Zellen schwanken zwischen $45,9 \pm 6,4\%$ bei Dreissena polymorpha und $96,4 \pm 8,7\%$ bei Cyrtodaria siliqua, in insgesamt 12 untersuchten Muschelspezies. Damit ist dieser Messparameter nur schwer auf andere Muschelarten übertragbar. Durch das wesentlich inhomogenere Ausgangsmaterial und die längere Versuchszeit sind nekrotische Zellanteile an Muschelhämozyten von Entenmuscheln schwerer als in Säugerzellkulturen zu bestimmen. Von einer direkten In vitro-Verwendung der durchflusszytometrischen Färbemethoden an Muschelhämozyten ist aufgrund des geringen Auflösungsbereichs und der Überlappung mit immuntoxischen Effekten abzusehen. Für In vivo-Ansätze sollten die Vitalitätsparameter als zusätzliche Kontrollfunktion für zytotoxische Effekte beibehalten werden.

4.5.2 Phagozytoseaktivität in vitro für Schwermetallverbindungen

An Muschelhämozyten konnten *in vitro* schon häufig immunmodulierende Effekte auf die Phagozytoseaktivität nachgewiesen werden [35] [82] [84] [78] [89] [95] [97] [85] [94]. Dass Muschelhämozyten von *Anodonta anatina* eine vergleichbare Sensitivität für Schwermetallverbindungen wie andere limnische und marine Muschelarten besitzen wurde in Tab. 17 in Kap. 4.2.6 demonstriert. Dennoch konnte auch aus den Versuchen mit anderen Xenobiotika abgeleitet werden (siehe Kap. 3.2.4 und Kap. 4.2.6), dass eine generelle Sensitivität für immuntoxische Wirkungen in heutigen Umweltkonzentrationen mit Muschelhämozyten nicht erreicht werden kann und für Einzelsubstanzen mehr als drei Größenordnungen von Belastungssituationen abweicht. Durch die Verwendung unterschiedlicher I*n vitro*-Testverfahren in dieser Arbeit stellt sich die Frage nach Sensitivitätsunterschieden zwischen Säugetierzelllinien und Muschelhämozyten. Für eine Beantwortung wurden die aus den Schwermetallversuchen ermittelten EC₅₀-Werte der Phagozytoseleistung logarhithmisch gegeneinander aufgetragen (Abb. 160).



Abb. 160: Sensitivitätsmuster der Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten und P388-Mausmakrophagen gegenüber Schwermetallverbindungen

Trotz der phylogenetischen Entfernung der verwendeten Zelltypen und der unterschiedlichen Expositionszeiten von 3 h bei Mausmakrophagen und 20 h bei Muschelhämozyten zeigte sich ein vergleichbares Sensitivitätsmuster beider Testverfahren. Die Hemmwirkungen der unterschiedlichen Schwermetalle im jeweiligen Testsystem können mehrere Zehnerpotenzen in der Konzentration auseinanderliegen, was den Bedarf einer integralen Erfassung von Schwermetallwirkungen anzeigt. Dabei ist die Unterschiedlichkeit der Hemmwirkungen bei den Muschelhämozyten ausgeprägter als bei den P388-Zellen. Methylquecksilberchlorid zeigt bei einer 600fach niedrigeren Konzentration die gleiche Hemmwirkung wie das Nickeldichlorid, was z.B. durch die längere Versuchszeit (20 h vs 3 h) gegenüber den P388-Mausmakrophagen zu erklären ist. Der Konzentrationsfaktor der EC₅₀-Werte liegt bei den P388-Zellen nur bei ca. 48.

Generell zeigte sich eine vergleichbare Sensitivität beider Testsysteme, nur beim Cadmiumdichlorid lagen die EC₅₀-Werte mehr als eine Zehnerpotenz auseinander. Die P388-Mausmakrophagen hatten im Mittel geringfügig höhere Sensitivitäten für Schwermetalle, doch ist der Konzentrationsbereich, in dem die Muschelhämozyten Hemmwirkungen anzeigen, bei den gleichen Schwermetallen breiter, was auf einen besseren Auflösungsbereich hinweist. Die Mechanismen der Phagozytosehemmung scheinen in Muschelhämozyten und Säugerzelllinien ähnlich zu sein, was auf eine Konservierung der Immunfunktionen schließen lässt, wie sie auch in anderen Quellen berichtet wird [58] [23]. Ein weiteres Beispiel für eine ähnliche *In vitro*-Sensitivität der Phagozytosaktivität in höheren Organismen bietet [129] für die Hemmwirkung des Methylquecksilberchlorids (Tab. 18).

Spezies	EC ₅₀ -Wert für CH ₃ HgCl [mol/l]	Standardabweichung	n
Moschusochse	1,0 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻⁵	4
Hund	2,5 x 10 ⁻⁶	3,3 x 10 ⁻⁷	4
Lama	1,8 x 10 ⁻⁵	2,1 x 10 ⁻⁵	3
Schaf	3,5 x 10 ⁻⁵	4,5 x 10 ⁻⁵	5
Pferd	1,4 x 10 ⁻⁵	5,1 x 10 ⁻⁶	9
Katze	2,6 x 10 ⁻⁵	8,3 x 10 ⁻⁶	5
Huhn	1,1 x 10 ⁻⁵	6,4 x 10 ⁻⁶	8

Tab. 18: Speziesbedingte EC₅₀-Werte der *In vitro*-Phagozytoseaktivität von Blutzellen nach Methylquecksilberchlorid-Exposition, verändert nach [129].

Die mittleren EC₅₀-Werte der Phagozytoseaktivität differieren meist weniger als eine Zehnerpotenz in der Konzentration und liegen vergleichbar mit dem Wert von Muschelhämozyten von *Anodonta anatina* mit 1,9 x 10⁻⁵ mol/l für Methylquecksilberchlorid. Eine vollständige Bewertung von immuntoxischen Potenzialen erfordert jedoch die Erfassung von zellulären und humoralen Aspekten der Immunfunktion [36]. Neben der zellulären Phagozytoseaktivität wurde die extrazelluläre ROS-Produktion *in vitro* an Muschelhämozyten untersucht und in Kap. 4.2.7 diskutiert.

4.5.3 Phagozytoseaktivität *in vivo*, *in vitro* und im Vergleich zum toxikologischen Endpukt für Mortalität von Mollusken

Mollusken können effektive multidisziplinäre Modelle der Umwelttoxikologie sein, da sie ubiquitär vorkommen, hoch konservierte Kontroll-und Regulationsmechanismen besitzen, die häufig Homologien zu Vertebraten-Systemen besitzen und sensitiv für anthropogene Einflüsse sind [21].

Als phylogenetisch relativ alte Organismen verfügen Muscheln hauptsächllich über angeborene unspezifische Immunfunktionen, die ihren Schwerpunkt auf der zellvermittelten Immunantwort haben [11]. Nicht zuletzt deshalb konnten zahlreiche immunmodulierende Einflüsse von diversen Xenobiotika an der Phagozytoseaktivität nach *In vivo*-Expostionen von Muscheln nachgewiesen werden [43] [79] [76] [81] [83] [88] [90] [77] [51] [91] [92] [96] [97] [98]. Die zentrale Rolle der Phagozytose in der Immunabwehr und ihre Sensitivität gegenüber xenobiotischen Umweltchemikalien in mehreren Spezies machen sie vielleicht zum idealen biologischen Endpunkt für Muscheln [51].

Um dieser These auch für unseren Testorganismus *Anodonta anatina* nachzugehen, wurden Expositionsszenarien mit Muscheln und Schwermetallverbindungen, die die geringste (NiCl₂) und die stärkste Hemmwirkung (CH₃HgCl) auf die Phagozytoseaktivität der Muschelhämozyten besaßen (siehe Abb. 160 in Kap. 4.5.2 und Kap. 3.3), durchgeführt. Bei den *In vivo*-Expositionen konnten für das Nickeldichlorid Effekte in einer über 2300fach niedrigeren Konzentration und beim Methylquecksilberchlorid sogar Effekte in einer über 11000fach niedrigeren Konzentration gegenüber den *In vitro*-Versuchen mit Muschelhämozyten nach einem Expositionsintervall von 2 Wochen gefunden werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass bei dem Testorganismus *Anodonta anatina* die *In vivo*-Laborexposition für Umweltprobenuntersuchungen aufgrund ihrer wesentlich höheren Sensitivität zu bevorzugen ist.

Ob der Testorganismus überhaupt empfindlich genug mit den Immunparametern für Phagozytoseaktivität reagiert, sollte ein Datenbankvergleich mit der ökotoxikologischen Datenbank der US-amerikanischen Environmental Protection Agency (EPA) zeigen. Dazu wurden die I*n vitro*- und *In vivo*-Nachweisgrenzen für signifikante Veränderungen der Phagozytoseaktivität anderen Mollusca-Biotestergebnissen (EC₅₀-Werte) der Datenbank für den Endpunkt Mortalität gegenübergestellt (siehe Abb. 161).

Die *In vitro*-Nachweisgrenzen der Phagozytoseaktivität liegen über den Mortalitätsbereich anderer Mollusken und würden erst in letalen Konzentrationen Effekte anzeigen. Um spezifische Wirkungen nachzuweisen, sollte es möglich sein, allgemeine zytotoxische und toxische Wirkungen von den spezifischen Wirkungen getrennt voneinander auflösen zu können, auch wenn es einen Überlappungsbereich gibt. Dieses gelingt mit den verwendeten *In vitro*-Methoden nicht. Die Methoden eignen sich also nicht, um subletale Wirkungen anzuzeigen. Hingegen liegen die *In vivo*-Nachweisgrenzen der Phagozytoseaktivität weitgehend unterhalb des Mortalitätsbereichs anderer Mollusken und können eine spezifische subletale Wirkrichtung (siehe Abb. 2 in Kap. 1.1.3) mit hoher Sensitivität anzeigen (siehe Abb.161).



Abb. 161: Empfindlichkeitsvergleich *In vivo-* und *In vitro-*Versuche für Phagozytoseaktivität mit anderen Mollusca-Biotestergebnissen (EC₅₀-Werte der Mortalität) der US-EPA für Nickeldichlorid, Quecksilberdichlorid und Methylquecksilberchlorid.

Leider waren nicht genügend Mollusca-Biotestergebnisse für das Methylquecksilberchlorid (n=6) vorhanden, so dass die Biotestergebnisse für das Quecksilberdichlorid zusätzlich dargestellt wurden, obwohl noch keine *In vivo*-Expositionsversuche mit der Substanz durchgeführt wurden. Das Verhältnis der Nachweiskonzentrationen von organischem und anorganischem Quecksilber *in vitro* liegt unter 4. Nimmt man eine 10- oder sogar 50fach niedrigere I*n vivo*-Wirksamkeit des anorganischen Quecksilbers gegenüber dem organischem Quecksilber an, so liegt diese ebenfalls im nichtletalen Bereich.

Über die Ursachen für diesen erheblichen Sensitivitätsunterschied von *In vitro-* und *In vivo-*Testsstrategien kann weitgehend nur spekuliert werden, doch sollen zumindest einige Erklärungsansätze genannt werden. Immuntoxine haben im gesamten Organismus wesentlich mehr Angriffsflächen als auf isolierte Zellen, und die von Immuntoxinen ausgelösten Wirkungen besitzen längere Manifestationszeiten, die sich in ihrer Ausprägung verstärken können. So kann, z.B. ein Immuntoxin sich negativ auf die Hämatopoese auswirken und die Reifung von Hämozyten und deren Funktionalität nachhaltig stören. Bioakkumulationen von Xenobiotika können in Muscheln lokale Konzentrationen verursachen, die um den Faktor 10³ bis 10⁵ höher liegen (siehe Kap. 3.3.4) als entsprechende Umweltkonzentrationen, und vermögen die lysosomale Stabilität herabzusetzen, was zu Schädigungen der Hämozyten führen kann (siehe Kap. 1.2.4.2). Die komplexen Regulationsmechanismen der Immunabwehr bieten ebenfalls weitere Angriffsflächen. Da die grundlegenden Mechanismen der immunologischen Phagozytoseaktivität durch das Tierreich von den Mollusken bis zu den Säugetieren stark konserviert [58] [23] sind, ist von einer ökotoxikologischen Relevanz organismenübergreifend auszugehen. Der Vorteil von *in vivo*-Tests ist, dass sie direkt letale und chronische oder subchronische Effekte anzeigen können und damit auch ökotoxikologisch relevantere Aussagen erlauben. Zudem können alle relevanten Zellen des exponierten Organismus abgefragt werden. Dieser Vorteil wird auf Kosten einer niedrigeren Praktikabilität, interindividueller Fehlergrößen und mit einem höheren Zeitaufwand erkauft. Nachteile der *In vitro*-Methoden sind, dass sie nur Potenziale abbilden und auch verstärkt mit der von Gefahr falsch positiven Testergebnissen unzuverlässig reagieren können. Auf die Schwächen der statistischen Auswertungsmöglichkeit der Expositionsversuche wurde bereits in Kap. 4.3.3 eingegangen.

Die *in vivo*-Ergebnisse der Referenzsubstanzversuche und auch der Abwasserversuche (siehe Kap. 4.3.1 und 4.3.2) zeigen deutlich, dass immunmodulierende Wirkungen auf die Phagozytoseaktivität mit Entenmuscheln in Konzentrationsbereichen zu bestimmen sind, in denen keine allgemeintoxischen Effekte zu erwarten sind.

Aufgrund der erheblichen Sensitivitätsunterschiede zwischen der *In vitro*- und *In vivo*- Erfassungsebene und auch basierend auf der Möglichkeit, Abwassertestungen mit mehreren Immunparametern (Phagozytoseaktivität, ROS-Produktion, vitale Hämozytendichte und nekrotische Zellanteile) durchzuführen, die ein gutes Spektrum der Immunfunktionen abbilden, ist der Testorganismus *Anodonta anatina* geeignet, integrativ immuntoxische Effekte unter Laborbedingungen anzuzeigen.

4.6 Mögliche Antwortmuster der funktionellen Immunparameter in vivo

Jede biologische Antwort auf eine ökotoxikologische Wirkung besitzt nach Wahl der Organisationsebene und der entsprechenden Bestimmungsmethode eine eigene Kinetik (siehe Abb. 1 in Kap. 1.1.1). Mit den hier verwendeten *In vitro*-Testverfahren können nur akute Effekte angezeigt werden, bei den *In vivo*-Testverfahren steht ein viel größerer Zeitraum bis zur Manifestation von Effekten zur Verfügung, wobei das entsprechende Antwortmuster auf eine Belastungssituation Berücksichtigung finden muss. Sowohl für die *In vitro*- als auch für die *In vivo*-Erfassungsebene konnten konzentrationsabhängig stimulierende und hemmende Antworten in den Funktionsparametern der Phagozytoseaktivität und der ROS-Produktion gefunden werden (siehe Kap. 3.2.2, 3.2.5, 3.3 und 3.4.2), wobei sich nur die *In vivo*-Versuche mit *Anodonta anatina* als ausreichend sensitiv erwiesen.

Nicht nur für die Phagozytoseaktivität, sondern auch für die ROS-Produktion wurden konzentrationsbedingt in den Referenzsubstanz- und Abwasserversuche sich wiederholende Antwortmuster gefunden, die vereinfacht dargestellt werden sollen (Abb. 162).



Abb. 162: Modell der Antwortmuster der funktionellen Immunparameter aus den In vivo-Expositionsversuchen

ROS-Produktion

Die In vivo-Antwort der ROS-Produktion auf Schwermetall- und Abwasserexposition von Anodonten zeigte eine ähnliche Empfindlichkeit wie die Phagozytoseaktivität, doch trat eine entgegengesetzte Antwortrichtung zur Phagozytoseaktivität auf. Aktivierungen der ROS-Produktion können auch durch andere Literaturguellen an anderen Muschelarten belegt werden. So erhöhen niedrige Kupferexpositionskonzentrationen die intra-und extrazelluläre ROS-Produktion an Superoxidanionen in Mytilus edulis, doch führen höhere Konzentrationen zu Hemmungen der ROS-Produktionen [43]. Für Schwermetalle wie Cd und Cu konnten in vivo an Ostrea edulis stimulierende Effekte auf die ROS-Produktion in niedrigen Konzentrationen (1 bis 10 µM Cd) nachgewiesen werden; bei höheren Konzentrationen (50 µM Cd) bricht die ROS-Produktion ein [80]. Dass Muscheln nicht nur artspezifisch unterschiedlich in ihren Immunparametern reagieren, sondern die Immunparameter auch unterschiedlich sensitiv in der gleichen Art sein können, wurde in [88] beschrieben. Es ist möglich, dass die ROS-Antwort in Anodonta anatina nach einer zweiwöchigen Exposition stimuliert, aber der Messparameter der Phagozytoseaktivität aufgrund einer höheren Sensitivität schon gehemmt vorliegt. Da neben Ausgangs-, Belastungs- und Regenerationszustand keine weiteren Messpunkte zur Verfügung standen, ist der Antwortsverlauf für die ROS-Produktion leider nur spekulativ. Auch bleibt unklar, ob dieses Antwortmuster für andere immuntoxische Umweltchemikalien, z.B. Pharmazeutika oder PAK und PCB eingehalten wird oder konzentrationsabhängig variiert.

Phagozytoseaktivität

Die Phagozytoseaktivität von *Andonta anatina* wurde während kurzer Expositionintervalle mit hohen Schwermetallkonzentrationen kurzfristig erhöht, es kam zu einer "Stressaktivierung". Höhere Konzentrationen der getesteten Schwermetalle führten in der Regel zu signifikanten Hemmungen der Phagozytoseaktivität nach längerer Exposition (7d, 14d), hingegen zeigten niedrigere Konzentrationen auch signifikante Aktivierungen (nicht in Abb. 162 gezeigt).

Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit Laborversuchen von anderen Muschelarten, in denen sich die Phagozytosaktivität von Mytilus edulis in kurzzeitigen Expositionen und niedrigem Belastungsgrad erhöht, sich aber bei längerer Expositionszeit und höheren Konzentrationen reduziert [36]. Ein ähnliches Antwortmuster (biphasische Antwort) ergab sich auch nach Abwasserexposition mit Elliptio complanata, bei denen 10% ige Abwasserkonzentrationen zur Erhöhung der Phagozytoseaktivität führten und 25 und 50% ige Abwasserkonzentrationen signifikante Reduzierungen der Phagozytoseaktivität nach 4 Tagen zeigten [19]. Wie in Kapitel 1.2.1 erläutert, können beide Formen der Dysregulation (Immunosupresssion und -stimulation) toxikologische Konsequenzen bewirken. Eine Immunosuppression kann beispielsweise die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen und Tumorzellen erhöhen, eine Immunstimulation kann, z.B. durch dauerhafte Generierung von oxidativem Stress die Cancerogenese durch Tumorinitiation und Tumorpromotion fördern [56]. Der im Modell gezeigte mögliche Belastungszustand nach 2 Wochen Exposition besitzt demnach ein erhöhtes cancerogenes Potenzial, da durch die Stimulation des oxidative Burst die Cancerogenese gefördert wird, aber gleichzeitig durch die Suppression der Phagzytoseantwort die Verteidigungsfähigkeit gegenüber Tumorzellen herabgesetzt wird.

Eingriffe in die Integrität des Organismus, z.B. nach einer Punktion, zeigen nach dreiwöchiger Regeneration keine messbaren Veränderungen in den vitalen Hämozytendichten und der Phagozytoseaktivität. Nach einer zweiwöchigen Exposition mit Immuntoxinen und einer anschließenden dreiwöchigen Regenerationsphase ist die Phagozytosaktivität weiterhin leicht stimuliert, was ein anhaltendes immunmodulatives Potenzial anzeigt (siehe Abb. 156 in Kap. 4.3.2.4). Diese Aktivierung trat nach NiCl₂- und Abwasserexposition auf, obwohl keine nennenswerte Bioakkumulation für NiCl₂ nach einer zweiwöchigen Exposition nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 121 in Kap. 3.3.5). Sicherlich wirft dieses Modell eine Reihe weiterer Fragen auf, und so muss auch seine Stichhaltigkeit in größeren Nachversuchen noch belegt werden. Doch lässt sich ableiten, dass Immunfunktionen einem zeitlichen Verlauf folgen, der in subletalen Konzentrationsbereichen aktivierende und hemmende Antworten bewirkt.

4.7 Funktionelle Immuntoxizität

Das Immunsystem ist essentiell für das längerfristige Überleben von Organismen. Seine Komplexität ist derzeitig nur teilweise verstanden, gleichsam bilden spezifische und unspezifische Immunfunktionen eine ausschlaggebende Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase und Immunregulation [15]. Schädigungen des Immunsystems können alle Aspekte einer Immunabwehr von der ersten Erkennung der Fremdstoffe, über die intrazellulären Signalkaskaden zur Ausschüttung von Signalstoffen bis hin zur endgültigen Eliminierung von Fremdkörpern betreffen [130]. Es werden zwei grundlegende Antwortrichtungen bei der Beeinflussung (Modulation) der Immunfunktionen beschrieben, die Immunostimulation und die Immunsuppression (siehe Abb. 3 in Kap. 1.2.1).

Durch die strukturelle und organisatorische Komplexität und Variabilität des Immunsystems mit seinen verschiedenen Funktionen sind die Wirkungen von Umweltbedingungen und Umweltchemikalien schwer vorherzusagen, da meist verschiedene Modulatoren (siehe Abb. 158 in Kap. 4.4) zusammenwirken und sich gegenseitig beeinflussen können. Bei der Vielzahl der Beeinflussungsmöglichkeiten des Immunsystems wird klar, dass eine realistische Bewertung von immuntoxischen Effekten nur auf einer Batterie von Testverfahren mit verschiedenen immunologischen Endpunkten beruhen kann [13] [76]. Eine vollständige Bewertung der immuntoxischen Potenziale von Schadstoffen sollte durch die Verwendung von zellulären und humoralen Aspekten der Immunfunktionen erfolgen [36]. Die Verwendung von mehreren immuntoxikologisch relevanten Endpunkten minimiert das Risiko falsch negativer oder positiver Aussagen über immuntoxische Wirkungen in Organismen.

Dennoch besteht ein großes Ungleichgewicht bei der Betrachtung von funktionellen und strukturellen immuntoxikologischen Endpunkten in Säugetieren und Invertebraten, welches nicht zuletzt durch die Unterschiedlichkeit der Komplexitätsgrade der Immunsysteme verursacht wird auch wenn gleichsam homologe Funktionen (z.B. Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion) vorhanden sind (siehe Abb. 4 in Kap. 1.2.1).

Die funktionellen Aspekte der Immuntoxikologie besitzen nur untergeordneten Stellenwert bei den Standard-Toxizitätsstudien der Industrie für humane Pharmazeutika [131]. In dieser wird Immuntoxizität als unbeabsichtigtigte Immunosuppression und –stimulation verstanden, wobei pharmazeutisch induzierte Hyperimmunität und Autoimmunität ausgeschlossen werden.

Tab. 19: Standard-Toxizitätsstudien	der Industr	ie zur	Erfassung	immuntoxischer	Effekte	von
humanen Pharmazeutika, aus [131].						

Parameter	Spezifische Komponenten		
Hämatologie	totale und absolute differentielle Leukozytenzählungen		
Klinische Chemie	Globulin-Level, bzw. Immunglobuline und Antikörper-		
	verhältnisse		
Pathologie	lymphoide Gewebe und Organe		
Organgewichte	Thymus, Milz, optional Lymphknoten		
Histologie	Thymus, Milz, Lymphnknoten, optional Konochenmark,		
	diverse lymphoide Gewebe		

Diese Studien werden standardisiert an Nagern nach 28tägiger Exposition durchgeführt und beruhen verstärkt auf struktureller Immuntoxizität (siehe Tab. 19). Nur einige funktionelle Immunparameter, wie Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion, Killerzellenaktivität u.a. werden unter den zusätzlichen Immuntoxizitätsstudien geführt und kommen zum Einsatz falls Ergebnislagen unschlüssig sind. In toxikologischen Ringtests konnten sich in der humanen Immuntoxikologie aufgrund der Komplexizität und der vielfältigen strukturellen Angriffsflächen des Säuger-Immunsystems Immunparameter etablieren und durchsetzen, die leider nicht auf Organismen mit einem weniger komplexen Immunsystem übertragbar sind und verstärkt auf struktureller Immuntoxizität basieren.

Ziel dieser Untersuchungen ist es, spezielle Gefährdungspotenziale für den Menschen abzubilden, dabei stellen die Granulozyten im menschlichen Organismus mehr als 60% der im Blut zirkulierenden Leukozyten dar und sind neben der Haut als erste Barriere des zellulären Immunsystems zu verstehen. Granulozyten sind bei bakteriellen Infektionen als schnellste Zellen durch eine ausgeprägte Chemotaxis vor Ort [14]. Zusammen mit den Monozyten/Makrophagen sind sie zur Phagozytose befähigt. Neben diesem intrazellulärem Verteidigungsmechanismus sind Granulozyten, Monozyten und Makrophagen auch zu extrazellulären Verteidigungsaufgaben durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS-Produktion, oxidative Burst) in der Lage. Die Durchflusszytometrie bietet heutzutage die Möglichkeit diese Zellpopulationen getrennt voneinander zu bestimmen und deren Funktionalität simultan zu testen.

Wichtige Ansatzpunkte für eine Verständnisentwicklung des Immunstatus diverser Organismen sind daher die Entwicklung von wirkungsbezogenen Testverfahren für elementare evolutionär konservierte Funktionsweisen, um Einblick in ökotoxikologische Zusammenhänge höherer Relevanz zu erhalten. Auch wenn spezifische Funktionen und der Gedächtnischarakter der adaptiven Säugerimmunität nicht erfasst werden [77], wird eine Erfassung von Gefährdungspotenzialen für den Menschen damit nicht ausgeschlossen, selbst wenn sie nicht im Mittelpunkt der Betrachtungen steht.

Daher wurden die intrazellulären und extrazellulären Verteidungsfunktionen durch Phagozytose und ROS-Produktion, die sowohl bei Invertebraten und Vertebraten angeboren und relativ unspezifisch vorkommen, bei einem ökotoxikolgischen Ansatz bevorzugt. Der Vorteil der funktionellen Immunparameter liegt in der leichten Übertragbarkeit auf unterschiedliche Zelltypen, die eine gleiche oder ähnliche Funktion ausüben. Die in dieser Arbeit verwendeten Mess- und Testprinzipien (siehe Kap. 1.3.2) können sowohl an Zellkulturen als auch an Organismen angewendet werden. Besonders effektiv kann die Phagozytoseaktivität von Immunzellen durchflusszytometrisch bestimmt werden, da man gegenüber Mikrotiterplattenmethoden weniger stark auf minimale Zelldichten angewiesen ist und mehrere Messparameter gleichzeitig Auskunft über Phagozytoseaktivität und Vitalität der Zellen geben können. Eine gleichwertige Aussagequalität kann nur mit zeitaufwändigen mikroskopischen Untersuchungen derzeitig erreicht werden.

Zell- oder Gewebeschädigungen gehen oft auch mit dem Verlust der Funktion einher, daher sind wahrscheinlich die Funktionsparameter des Immunsystems besser geeignet, immunmodulative Wirkungen anzuzeigen, da sie systemische Fehlfunktionen in beiden Antwortrichtungen zusätzlich und eventuell früher erfassen können. Sö können, z.B. Immunosuppressionen auch ohne echte strukturelle Veränderungen einsetzen, wenn Signalkaskaden gestört werden [26]. Im angelsächsischen Sprachraum hat sich der Begriff "Immunocompetence" für die funktionellen Aspekte der Immunabwehr verbreitet und steht den strukturellen Veränderungen bzw. der "Immunopathology" gegenüber.

Der Begriff der funktionellen Immuntoxizität wurde in dieser Arbeit gewählt, da die funktionellen Immunparameter sich *in vitro* durch ähnliche Sensitivitätsmuster trotz phylogenetischer Distanz auszeichnen (siehe Abb. 160 und Tab.18 in Kap. 4.5.2) und mit geringem Anpassungsaufwand auf die *In vivo*-Ebene mit hohem Sensitivitätsgewinn übertragbar waren (siehe Abb. 161 in Kap. 4.5.3). Die funktionellen Immunparameter können eine gemeinsame Schnittfläche für die organismenübergreifende Darstellung und Identifizierung immuntoxischer Effekte bieten, hingegen sind die strukturellen Immunparameter stärker von der jeweiligen Komplexizität des Immunsystems der Organismen abhängig.

4.8 Ausblick

Obwohl der Testorganismus Anodonta anatina in den Abwasserversuchen immuntoxische Potenziale in Verdünnungsstufen anzeigen und klassifizieren konnte, in denen mit den klassischen Testsystemen der aquatischen Ökotoxikologie keine toxischen Effekte mehr nachzuweisen waren, bleibt zu überprüfen, ob die In vivo-Laborexpositionsversuche auch auf ein breites Spektrum von immuntoxischen Xenobiotika reagiert. Bisher konnte dies nur in Referenzsubstanzversuchen mit Nickel- und Methylquecksilberchlorid (siehe Abb. 161 in Kap. 4.5.3), die auch zu den prioritären Schadstoffen der europäischen WRRL gehören, demonstriert werden. Dabei sollte überprüft werden, ob die Antwortmuster (siehe Kap. 4.6) auch bei anderen immuntoxischen Substanzgruppen auftreten und sich ein einheitliches Expositionsintervall ableiten lässt, in dem zuverlässig immuntoxische Potenziale nachgewiesen werden können. Ebenfalls ist zu überprüfen, ob die prozentualen Variationskoeffizienten der funktionellen Immunparamter sich durch eine Erhöhung der Versuchstieranzahl oder durch veränderte Auswahlkriterien (z.B. durch engere Altersklassen) reduzieren lassen und der Versuchsaufwand in praktikablen Rahmen bleibt. Die Ergebnisse lassen auf eine hohe Sensitivität der erarbeitenden Immunparameter für Phagozytoseaktivität und ROS-Produktion schließen, die um mindestens 3 Zehnerpotenzen in der Konzentration höher liegt, als in den In vitro-Ansätzen mit getesteten Schwermetallverbindungen. Eine Übertragbarkeit der Hälterungs-, Expositions- und Messmethoden auf andere Laboratorien ist ebenfalls eine noch ausstehende Notwendigkeit für eine Validierung der Methoden. Weitere Ansatzpunkte für eine Erfassung immuntoxischer Potenziale und Effekte der Ökotoxikologie sollten gesucht und gefunden werden, damit die anthropogenen Einflüsse auf die Umwelt quantifizierbar, bewertbar und steuerbar werden und Vorsorge- und Nachhaltigkeitskriterien entsprechen können.

5 Literaturverzeichnis

[1] Fent (2003) : Ökotoxikologie. Thieme-Verlag, Stuttgart

[2] Braunbeck, T. (1993): Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen und mollusken zum Nachweis letaler und subletaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser. PAÖ 7: 537-559

[3] Krebs F. (2001): Ökotoxikologische Baggergutuntersuchung, Baggergutklassifizierung und Handhabungskatagorien für Baggergut. In: Untersuchung und Bewertung von Sedimenten, Calmano W., Springer-Verlag Berlin Heidelberg

[4] Kase R., Hansen P.-D., Fischer B.,
Heiniger P., Manz W., Reifferscheid G.
(2007): Integral Assessment of Estrogenic
Potenitals of Sediment-AssociatedSamples. Part I: The Influence of salinity
on the *in vitro* tests ELRA, E-screen and
YES. Env Sci Pollut Res,
DOI:http://dx.doi.org/10.1065/espr2007.06.
429

[5] Hansen P.-D. (2002): Unerwünschte Wirkungen.Kapitel 8.2: 550-563, In: Wasser. Höll K., Walter de Gruyter, Berlin, New York

[6] Reifferscheid G., Claus E., Manz W.
(2005): Spezifische toxische Wirkungen in der Sedimentbewertung. Nachweis spezifischer Wirkungen und Identifikation verursachender Stoffe. Vom Wasser, Vol. 103: 3-25

[7] ISO 13829 Water Quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water using the *umu*-Test [8] ISO 16240/FDIS Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water using the *Salmonella*/microsome assay (Ames test)

[9] ISO 21427-2 Water Quality – Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei- Part 2: Mixed population method using the cell line V79

[10] Kase R. (2004): Salinitätseinflüsse auf suborganismische Testsysteme zur Erfassung von ökotoxikologischen Sedimentwirkungen. Diplomarbeit, angefertigt an der TU Berlin am Institut für Ökologie im Fachgebiet Ökotoxikologie.

[11] Siefert G. , Meier R. (1990): Einführung in die Immunbiologie. Quelle & Meyer Verlag, Heidelberg, Wiesbaden

[12] House R. V. (2005): Transgenic Rodent Models in Immunotoxicology. In: Investigative Immunotoxicology. Tryphonas et al., Chapter 22: 345-362

[13] Luster M. I. et al. (1988): Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicology: national toxicology program`s guidelines for immuntoxicity evaluation in mice. Fundam. Appl. Toxicol. , Vol. 10: 2-19

[14] Hockertz S. (1997): Immunsystem. In: Toxikologie. Marquardt H., Schäfer S.G., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin: 257-270 [15] Blakley B. R. , Kouassi E. (2005): Structural and Functional Complexity of the Immune System and Its Relationship to Immunotoxicology. In: Investigative Immunotoxicology. Tryphonas et al., Chapter 1: 3-10

[16] Viarengo A. , Canesi L. (1991): Mussels as biological Indicators of pollution.Aquaculture, 94: 225-243

[17] Philipps D. J. H. (1995): The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. Mar. Pollut. Bull. Vol. 31: 193-200

[18] Petushok N., Gabryelak T., Palecz D., Zavodnik L., Szollosi Varga I., Deer K. A. (2002): Comperative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments. Aquatic toxicology, Vol. 61: 65-72

[19] Blaise C., Trottier S., Gagne F., Lallement C., Hansen P.-D. (2002): Immunocompetence of Bivalve Hemocytes as Evaluated by a Miniaturized Phagocytosis Assay. Environ Toxicol., Vol.17: 160-169

[20] Roesijadi G., Brubacher L. L., Unger M. E., Anderson R.S. (1997): Metallothionein m RNA Induction and Generation of Reactive Oxygen species in Molluscan Hemocytes Exposed to Cadmium *In Vitro*. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 118C, No. 2: 171-176

[21] Ritschoff D. , Mc Clellan-Green P.(2005): Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. Mar.Pollut. Bull. Vol. 50: 369-373 [22] Auffret M., Rousseau S., Boutet I., Tanguy A., Baron J., Moraga D., Duchemin M. (2006): A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranea. Ecotoxicology and Environmental safety, Vol. 63: 393 – 405

[23] Hegaret H., Wikfors G. H., Soudant P.
(2003): I. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters,
Crassostrea virginica, subjected to a sudden temperature elevation. II. Haemocyte functions: aggregation, viability,
phagocytosis, and resiratory burst. Journal of Experimental marine Biology and Ecology, Vol. 293: 249-265

[24] Pipe R. K., Coles J. A., Thomas M.
E., Fossato V. U., Pulsford A. L. (1995):
Evidence for environmentally derived immunmodulation in mussels from the
Venice Lagoon. Aquatic Toxicology, Vol.
32: 59-73

[25] Siegmund Eckart (2001): Untersuchungen von Hämozyten von Mytilus edulis. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie der Universität Hamburg.

[26] Auffret, M. (2005): Bivalves as Models for Marine Immuntoxicology. In: Investigative Immunotoxicology. Tryphonas et al., Chapter 3: 29-62

[27] Cheng T. C. (1981): Bivalves. - InInvertebrate Blood Cells, Vol.1 Ratcliffe N.A.and Rowley A. F. Academic Press,London: 233-300

[28] Cheng T.C. (1975): Functional Morphology and Biochemistry of Molluscan Phagocytes. Annals of the New York Academy of Sciences No. 266: 343-379

[29] Auffret M. (1988): Bivalve Hemocyte Morphology. American Fisheries Society special Publication No. 18: 169-177

[30] Auffret M. , Oubella R. (1995): Cytological an Cytometric Analysis of Bivalve Mollusc Hemocytes. In Techniques in Fish Immunology-4, Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates. Stolen J. S.et al., SOS Publications, Fair Haven, NJ: 67-70

[31] Sun J., Wu X., Zhang W. (2006) : Morphological, structural and functional characteristics of the hemocytes of the oyster, *Crassostrea ariakensis*. Journal of Shellfisch research, Vol. 25, No.1: 55-64

[32] Auffret M., Oubella R. (1994): Cytometric Parameters of Bivalve Molluscs : Effect of Environmental Factors. In: Modulators of Fish Immune Response. Stolen J. S.et al., SOS Publications, Fair Haven, NJ: 23-32

[33] Haeckel E. (1862): Die Radiolarien. Geo. Reimer, Berlin

[34] Wehner R., Gehring W. (1995): Zoologie. 23. Auflage, Georg Thieme Verlag New York.

[35] Brousseau P., Pellerin J., Morin Y.,
Cyr D., Blakley B., Boermans H.,
Fournier M. (2000): Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. Toxicology,
Vol. 142: 145-156.

[36] Pipe R. K. , Coles J. A. (1995): Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 5: 581-595

[37] Robohm R.A. (1984): In vitro phagocytosis by molluscan hemocytes: An survey and critique of methods. In : Comparative Pathobiology, Cheng T.C. et al. , Vol. 6: 147-172

[38] Terahara K., Takahashi K. G., Nakamura A., Osada M., Yoda M., Takachika H., Hirasawa M., Mori K. (2006): Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Developmental and Comparative Immunology, Vol. 30: 667-683.

[39] Winston G. , Moore M. N., Kirchin M. A. , Soverchia C. (1996): Production of Reactive Oxygen Species by Hemocytes from the Marine Mussel , *Mytilus edulis* : Lysosomal Localization and Effect of Xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. , Vol 113 C, No. 2: 221-229

[40] Moore M. N. (1985): Cellular Responses to Pollutants. Marine Pollution Bulletin, Vol. 16, No. 4: 134-139

[41] Alvarez M. R., Friedl F. E., Johnson J. S., Hinsch G. W. (1989): Factors affecting in vitro phagocytosis by oyster hemocytes. Journal of invertebrate pathology, Vol. 64: 233-241 [42] Luengen A. C., Friedman C. S., Raimondi P. T., Flegal A. R. (2004): Evaluation of mussel immune responses as indicators of contamination in San Fransisco Bay. Marine Environmental research, Vol. 57: 197-212

[43] Pipe R. K., Coles J. A., Carissan F. M. M., Ramananathan K. (1999): Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. Aquatic Toxicology, Vol. 46: 43-54

[44] Anderson R. S., Mora L. M. (1995): Phagocytosis: a Microtiter Plate Assay. In: Techniques in Fish Immunology, Vol. 4, Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates. Stolen J. S.et al., SOS Publications, Fair Haven, NJ: 109 -112

[45] Alvarez M. R., Friedl F. E., Mulholland D. S. (1995): Flow Cytometric Analysis of Shellfish Hemocyte Phagocytosis.
In: Techniques in Fish Immunology, Vol. 4, Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates. Stolen J. S.et al., SOS Publications, Fair Haven, NJ: 73-76

[46] Goedken M., De Guise S. (2004):Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. Fish & ShellfishImmunology, Vol. 16: 539-552

[47] Monari M., Matozzo V., Foschi J.
,Cattani O., Serrazanetti G. P., Marin M.
G. (2007): Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 22: 98-114 [48] Lemaire N., Pellerin J., Fournier M., Girault L., Tamigneaux E., Cartier S., Pelletier E. (2006): Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel mytilus spp. from farm sites of eastern Quebec. Aquaculture, Vol. 261: 729-751

[49] Duchemin M. B., Fournier M., Auffret M.(2007): Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture, Vol. 264: 73-81

[50] Cajaraville M. P., Olabarrieta I., Marigomez I.(1996): *In vitro* Activities in Mussel Hemocytes as Biomarkers of Environmental Quality: A Case Study in the Abra Estuary (Biscay Bay). Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 35: 253-260

[51] Fournier M., Pellerin J., Lebeuf. M., Brousseau P., Morin Y., Cyr D. (2002): Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactomeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytotic activity of hemocytes. Aquatic Toxicology, Vol. 59: 83-92

[52] Chen J. H., Bayne C. (1995) : Bivalve Mollusc Hemocyte Behaviors: Characterization of Hemocyte Aggregation and Adhesion and Their Inhibition in the California Mussel (*Mytilus californianus*). Biol. Bull., Vol. 188: 255-266

[53] Auffret M., Oubella R. (1997): Hemocyte Aggregation in the Oyster *Crassostrea gigas*: *In Vitro* Measurement and Experimental Modulation by Xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 118 A, No.3 : 705-712 [54] Cheng T. C., Howland K. H. (1982): Effects of Colchicine and Cytochalasin B on Chemotaxis of Oyster (*Crassostrea virginica*) Hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology, Vol. 40: 150-152

[55] Fisher W. S. , Tamplin M. (1988): Environmental Influence on Activities and Foreign-Particle Binding by Hemocytes of American Oysters, *Crassostrea virginica*.Can. J. Fish. Aquat. Sci. , Vol. 45: 1309-1315

[56] Younes M. (1997):Freie Radikale und Reaktive Sauerstoffspezies. In: Toxikologie. Marquardt H. , Schäfer S.G. , Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin: 94-105

[57] Haber F. , Weiss J. (1934): The catalytic decomposition of hydrogenperoxide by iron salts. Proc. R. Soc., London, Vol. 147: 332-351

[58] Roos D. (1980): The metabolic response to phagocytosis. In: The CellBiology of Inflammation, Glynn L. E. et al.,Elsevier, Amsterdam, Chapter 11: 337-388

[59] Pipe R. K. , Porte C. , Livingstone D. R. (1993) : Antioxidant enzymes associated with the blood cells an hemolymph of the mussel *Mytilus edulis.* Fish & Shellfish Immunology, Vol. 3: 221-233

[60] Regoli F. (1992): Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. Marine Ecology Progress series, Vol. 84: 63-69 [61] Anderson R. (1994): Hemocytederived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. Developmetal and Comparative Immunology, Vol. 18, No. 2: 89-96

[62] Wooton E. C., Dyrynda E. A. , Ratcliffe N. A. (2003): Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (Mytilus edulis), the edible cockle (Cerastoderma edule) and the razor-shell (Ensis siliqua). Fish & Shellfish Immunology, Vol. 15: 195-210

[63] Wotton E.C., Pipe R. K. (2002): Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 15: 249-262

[64] Pick E., Keisari Y. (1980): A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. Journal of Immunological Methods, Vol. 38: 161-170

[65] Pipe R. K. (1992): Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*.Developmental and Comparative Immunology, Vol. 16: 111-122

[66] Bender R. C. , Broderick E. J. , Goodall C. P. , Bayne C. J. (2005): Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* Hemocytes: *Schistosoma mansoni* – resistant snails produce more extracellular H_2O_2 than susceptible snails. Jounal of Parasitology, Vol. 91: 275-279. [67] Adema C. M. , van Deutekom-Mulder E. C. , van der Knaap W.P.W. , Sminia T. (1993): NADPH-oxidase activity : the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod Lymnaea stagnalis. Journal of Leukocyte Biology, Vol. 54: 379-383

[68] Roch P. (1999): Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquaculture 172: 125-145

[69] Santarem M., Figueros A. (1995): Basic Studies on Defense Mechanisms of Mussels. In: Techniques in Fish Immunology, Vol. 4, Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates. Stolen J. S.et al., SOS Publications, Fair Haven, NJ: 87-92

[70] Mitta G., Vandenbulcke F., Noel T., Romestand B., Beauvillain J. C., Salzet M., Roch P. (2000): Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. Journal of Cell Science, Vol. 113: 2759-2769

[71] Hentoth B. (2003): The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysacharide in the blue mussel , *Mytilus edulis*. Fish & Shellfisch Immunology, Vol.14 : 25-37

[72] Torreilles J., Romestand B. (2001): In vitro production of peroxynitrite by haemocytes from marine bivalves: C-ELISA determination of 3-nitrotyrosine level in plasma proteins from *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas*. BMC Immunology, 2:1 [73] Mitta G., Hubert F., Dyrynda E. A., Boudry P., Roch P. (2000): Mytlin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. Developmental and Comparative Immunology 24: 381-393

[74] Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F.
, Salzet M., Roch P. (2000): Involvment of Mytilins in Mussel Antimicrobial Defense.
The Journal of Biological Chemistry, Vol.
275, No. 17: 12954 -12962

[75] Duchemin M., Fournier M., Gauthier-Clerc S., Auffret M. (2007): Four-year investigation of a frmework to the use of immune endpoint for environmental risk assessemet in coastal marine ecosystems: findings and future challenges. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, SETAC Europe 17th Annual Meeting in Porto 2007.

[76] Parry H. E. , Pipe R. K. (2004): Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). Aquatic toxicology, Vol. 69: 311-325

[77] Anderson R. S. (1988): Effects of Anthropogenic Agents on Bivalve Cellular and Humoral Defense Mechanisms.American Fisheries Society Special Publication, Vol. 18: 238-242

[78] Sauve S., Brousseau P., Pellerin J.,
Morin Y., Senecal L., Goudreau P.,
Fournier M. (2002): Phagocytotic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). Aquatic Toxicology, Vol. 58: 189-200

[79] Thiagarajan R., Gopalakrishnan S. Thilagam H. (2006): Immunomudulation in the Marine Green Mussel *Perna viridis* Exposed to Sub-Lethal Concentrations of Cu and Hg. Arch. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 51: 392-399

[80] Auffret M., Mujdzic N., Corporeau C., Moraga D. (2002): Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Marine Environmental Research, Vol. 54: 585-589

[81] Coles J. A., Farley S. R., Pipe R. K. (1995): Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. Diseases of Aquatic Organisms, Vol. 22: 59-65

[82] Gagnaire B., Thomas-Guyon H.,
Renault T. (2004): In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemo-cytes. Fish & Shellfish Immunology, Vol.
16: 501-512

[83] Fournier M., Pellerin J., Clermont Y., Morin Y., Brousseau P.(2001): Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytotic activity of hemocytes. Toxicology, Vol. 161: 201-211

[84] Cima F. , Marin M. G. , Matozzo V. , Da Ros L. , Ballarin L. (1998): Immunotoxic effects of organotinn compounds in *Tapes philippinarium*. Chemosphere, Vol. 37, 14-15 : 3035-3045 [85] Bouchard N., Pelletier E., Fournier M. (1999): Effects of butyltin compounds on phagocytotic activity of hemocytes from three marine bivalves. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 18, No. 3: 519-522

[86] Fisher W. S., Wishkovsky A., Chu F.L. E. (1990): Effects of Tributyltinn on
Defense-Related Activities of Oyster
Hemocytes. Arch. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 19: 354-360

[87] Coles J. A., Farley S. R., Pipe R. K.
(1994): Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine musse, *Mytilus edulis*. Aquatic Toxicology, Vol. 30: 367-379.
[88] Wootton E.C., Dyrynda E. A., Pipe R. K., Ratcliffe N. A. (2003): Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. Aquatic Toxicology, Vol. 65: 13-25

[89] Gomez-Mendikute A., Etxeberria A., Olabarietta I., Cjaraville M. P. (2002): Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. Marine Environmental Research, Vol.54: 431-436

[90] Mc Cormick-Ray M. G. (1987) : Hemocytes of *Mytilus edulis* Affected by Pruhoe Bay Crude Oil Emulsion. Marine Environmental Research, Vol. 22: 107-122

[91] Jeong W.-G. , Cho S.-M. (2005): Effects of polynuclear aromatic hydrocarbons on hemocyte characteristics of the pacific oyster, *Crassostrea gigas.* Journal of Shellfish Research, Vol. 24, No. 2: 451-456 [92] Fries C. R., Tripp M. R. (1980): Depression of phagocytosis in *Mercenaria* following chemical stress. Developmental and Comparative Immunology, Vol. 4: 233-244

[93] Canesi L., Ciacci C., Larusso L. C., Betti M., Scarpato A., Citterio B., Pruzzo C., Gallo G. (2003): Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinasemediated cell signaling. Aquatic Toxicology, Vol. 63: 293-306

[94] Canesi L., Lorusso L. C., Ciacci C., Betti M., Gallo G. (2005): Effects of the brominated flame retardant tetrabromobisphenol-A on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes: Involvement of MAP kinases and protein kinase C. Aquatic Toxicology, Vol. 75: 277-287

[95] Gagne F. , Blaise C. , Fournier M. , Hansen P.-D. (2006): Effects of selected pharmaceutical products on phagocytotic activity in *Elliptio complanata* mussels. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 143: 179-186

[96] Gagne F., Edge T., Douville M., Blaise C. (2006): Effects of Commercial Microbial Products on the Immune System of *Elliptio complanata* Mussels. Bull. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 76: 848-854

[97] Canesi L., Ciacci C., Larusso L. C., Betti M., Guarnieri T., Tavolari S., Gallo G. (2006): Immunomodulation by 17-βestradiol in bivalve hemocytes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, Vol. 29: 664-673 [98] Gauthier-Clerc S. , Pellerin J. , Fournier M. , Amiard, J.-C. (2006): Immunological and biochemical responses in *Mya arenaria* (Mollusca Bivalvia) exposed *in vivo* to estradiol-17 β . Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Vol. 144: 228-234

[99] Umweltbundesamt (2001): Nachhaltigkeit und Vorsorge bei der Risikobewertung und beim Risikomanagment von Chemikalien. Teil II: Umweltchemikalien, die auf das Hormonsystem wirken- Belastungen, Auswirkungen, Minderungsstrategien. Texte 30/01.

[100] Ordas M.C. , Albaiges J. , Bayona J. M. , Ordas A. , Figueras A. (2007) : Assessment of *In Vivo* Effects of the Prestige Fuel Oil Spill on the Mediterranean Mussel Immune System. Arch. Environ. Contam. Toxicol. , Vol. 52: 200-206

[101] Hagger J. A. , Depledge M. H. ,Galloway T. S. (2005): Toxicity of tributyltinn in the marine mollusc *Mytilus edulis*.Marine Pollution Bulletin Vol. 51: 811-816

[102] Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.(2004): Der Experimentator Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag. ISBN 3-8274-1450-4

[103] Ehrnsperger A. (2004): Transskriptionelle Regulation von MADDAM / ADAM19. Dissertation. Fakultät III-Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg, Regensburg, 2004 [104] Bunce C. M., Wallington L. A., Harrison P., Williams G. R., Brown G. (1995):Treatment of HL 60 cells with various combinations of retinoids and 1α , 25 dihydroxyvitamin D₃ results in differentiation towards neutrophils or monocytes or a failure to differentiate and apoptosis. Leukemia, No 9: 410-418.

[105] Spira D. (2006): Entwicklung eines *in vitro* Testverfahrens zum Nachweis von Immuntoxizität in der aquatischen Ökotoxikologie. Diplomarbeit der Fachhochschule Bingen, 2006

[106] DIN 38415-6: (2003): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasserund Schlammbehandlung – Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) – Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen, Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen (T6).

[107] Glöer P., Meier-Brook C., Ostermann O. (1992) Süßwassermollusken: Ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland. Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung, Hamburg.

[108] Pusch, M., Siefert, J., Walz, N. (2001): Filtration and respiration rates of two unionid species and their impact on the water quality of a lowland river.In: G. Bauer, K. Wächtler (Hrsg.): Ecology and Evolutionary Biology of the Freshwater Mussels Unionoidea. Ecological Studies Vol. 145, Springer Vlg. : 317-326 [109] Schöl A., Kirchesch V., Bergfeld T., Schöll F., Borcherding J., Müller D. (2002): Modelling the Chlorophyll a Content of the River Rhine – Interraltion between Riverine Algal Production an population Biomass of Grazers, Rotifers an the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. Internat. Rev. Hydrobiol., vol 87: 295-317

[110] Wahrendorf D.-S. (2001): Konzeption, Entwicklung und Realisierung eines höherstufigen Labortestsystems mit *Daphnia magna.*- Diplomarbeit. Zoologisches Institut der Technischen Universität Braunschweig, Braunschweig, März 2001

[111] DEV L33 - DIN 38 412 Part 33 (1991): German standard methods for the examination of water, waste water and sludge - Determination of the nonpoisonous effect of waste water to green algae (Scenedesmus chlorophyll fluorescence test) by dilution limits.

[112] DEV L30 - DIN 38 412 Part 30 (1989): German standard methods for the examination of water, waste water and sludge - Determination of the nonpoisonous effect of waste water to Daphnia by dilution limits.

[113] DEV L34 - DIN EN ISO 11348-3 (1998): Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria. [114] Krebs, F. (2005a). The pT-method as a Hazard Assessment Scheme for wastewaters.- In: C. Blaise and J.-F. Férard (eds.): Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, Volume 2: Hazard Assessment Schemes, Chapter 3: 115-137. Springer, Dordrecht, The Netherlands Krebs, F. (2005b). The pT-method as a Hazard Assessment Scheme for sediments and dredged material.- In: C. Blaise and J.-F. Férard (eds.): Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, Volume 2: Hazard Assessment Schemes, Chapter 9: 281-304. Springer, Dordrecht, The Netherlands

[115] Sachs, L. (1999): Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.9., überarbeitete Auflage, Springer-Verlag, 1999.

[116] DIN 38406-E11 - 2 Bestimmung von Nickel mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) im Graphitrohrofen (E11), Berlin 1992

[117] DIN EN 1483: 1997 Bestimmung von Quecksilber. Empfohlene Analysenbedingungen für die Fließinjektions-Hydrid-/Kaltdampf-Technik mit dem FIAS-200. Angewandte Atomspektrometrie Nr. 2.4

[118] Pick E., Mizel D. (1981): Rapid
Microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunassay reader.
Journal of Immunological Methods, Vol.
46: 211-226

[119] Collins S. J. (1987): The HL-60 Promyleocytic Leukemia Cell Line: Proliferation, Differentiation, and Cellular Oncogene Expression. Blood, Vol 70, No. 5: 1233-1244 [120] Bramble L., Anderson R. S. (1997):
Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte Reactive Oxygen Species production by *Listonella anguillarum*. Developmental & Comperative Immunology, Vol. 21, No. 4: 337-348

[121] Fleck R. A., Romero-Steiner, Nahm M. H. (2005): Use of HL-60 Cell Line To Measure Opsonic Capacity of Pneumococcal Antibodies. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Vol. 12, No. 1:19-27

[122] Gustafson L. L., Stoskopf M. K., Bogan A. E., Showers W., Kwak T. J., Hanlon S., Levine J. F. (2005): Evalution of a nonlethal technique for hemolymph collection in *Elliptio complanata*, a freshwater bivalve (Mollusca: Unionidae). Diseases of Aquatic Organisms, Vol. 65: 159-165

[123] Ortmann C. (2003): Energiestoffwechsel der Körbchenmuschel (*Corbicula fluminea*) bei offenen und geschlossenen Schalen und ihre Schalenbewegungen im Rhein. Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

[124] Precht H. (1964): Anpassungen wechselwarmer Tiere im normalen Temperaturbereich und ihre Ursachen. Naturwissenschaftliche Rundschau, Heft 11: 438-442

[125] Ternes T. (2000): Rückstände von Arzneimitteln, Diagnostika und Antiseptika in Abwasser, Flüssen und Grundwasser.
Eine neue Herausforderung für die Wasserwirtschaft. Habilitationsschrift, Mainz (2000) [126] Manly R., George W. O. (1977): The occurrence of some heavy metals in populations of the freshwater mussel *Anodonta anatina* from the river Thames. Environ. Pollut., Vol. 14: 139-153

[127] Tschuschke, S. (2001): Das Cdinduzierbare crp-Gen aus dem terrestrischen Oligochaeten Enchytraeus: Gemomische Organisation und Bedutug für die Cd-Detoxifizierung. Dissertation der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

[128] Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer AbwV - Abwasserverordnung (2004) aus BGB I. I, Nr. 28 vom 22.6.2004 [129] Salo, H., Dautremepuits C., Smits
J. E. G., Brousseau P., Fournier M.
(2005): Immune Markers in Ecotoxicology:: A Comparison across Species. In
Investigative Immunotoxicology. Tryphonas et al., Chapter 10: 147-159

[130] Bilitewski, U. (2006): Biochemische Methoden in der Wasseranalytik - Stand der Technik und Perspektiven -Teil II: Organismische Tests. Vom Wasser-das Journal, 104(03): 7-19

[131] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals dor Human Use (ICH) (2006): Guidance for Industry: S8 Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals.

6 Anhang

6.1 Statistikanwendungen und -ergebnisse

6.1.1 Messparameter nach zweiwöchiger Abwasser- und Schwermetallexposition

Tab 20: Mann-Whitney-U-Testergebnisse des Einzelwertvergleichs der Messparameter der Abwasser- und Schwermetallexposition von Entenmuscheln. Abkürzungen: RS = Rangsumme; NK = Negativkontrolle; PK = Positivkontrolle, ROS = Reactive Oxygen Species; p-Niveau = Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Unterschiedlichlichkeit der Datenreihen; x $\leq 5\%$, xx $\leq 1\%$, xxx $\leq 0,1\%$)

	Phagozytose- leistung in Beads pro phagozytose- aktiver Hämozyt	Phago- zytose- anteil in%	Phagozytose- leistung in Beads pro Hämozyt	ROS-Produktion der ersten 90 min in µmol H₂O₂- Radikaläquivalente	vitale Hämozytenzahl pro ml nach der Punktion	nekrotischer Hämozytenanteil nach dem Phago- zytoseansatz in %
Ablauf kom. Abw.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Messwertanzahl NK	24	24	24	24	6	24
Messwertanzahl Probe	24	24	24	24	6	24
RS NK	564	594	579	555	32	570
RS Probe	612	582	597	621	46	606
U-Wert	264	282	279	255	11	270
p-Niveau	0,620691	0,901539	0,85277	0,49617	0,26233	0,710523
Zulauf kom. Abw.	n.s.	xxx	n.s.	ххх	n.s.	n.s.
Messwertanzahl NK	24	24	24	24	6	24
Messwertanzahl Probe	24	24	24	22	6	24
RS NK	597	394	569	333	46	601
RS Probe	579	782	607	748	32	575
U-Wert	279	94	269	33	11	275
p-Niveau	0,852777	0,000063	0,695218	0,000001	0,26233	0,788657
Ablauf ind. Abw.	n.s.	n.s.	n.s.	ххх	n.s.	n.s.
Messwertanzahl NK	24	24	24	24	6	24
Messwertanzahl Probe	20	20	20	18	5	20
RS NK	473	496	477	319	31	570
RS Probe	516	494	513	584	35	420
U-Wert	173,5	196	177	19	10	210
p-Niveau	0,117732	0,299695	0,137551	0,000001	0,361311	0,479501
Zulauf ind. Abw.	n.s.	ххх	x	xx	n.s.	n.s.
Messwertanzahl NK	24	24	24	24	6	24
Messwertanzahl Probe	20	20	20	20	6	20
RS NK	619	698	643	424	40	622
RS Probe	371	292	347	566	26	368
U-Wert	161	82	137	124	11	158
p-Niveau	0,062597	0,000196	0,01519	0,006255	0,465209	0,053267
Positivkontrolle	x	ххх	ххх	ххх	n.s.	n.s.
Messwertanzahl NK	24	24	24	24	6	24
Messwertanzahl Probe	24	24	24	24	6	24
RS NK	712	761	765	390	30	508
RS Probe	464	415	411	786	48	668
U-Wert	164	115	111	90	9	208
p-Niveau	0,010563	0,000361	0,000263	0,00045	0,14952	0,099031

6.1.2 Messparameter nach Regenerationsphase nach Abwasser-und Schwermetallexposition

Tab. 21: Mann-Whitney-U-Testergebnisse des Einzelwertvergleichs zwischen den Messwerten nach der Regenerations- und Expositionsphase der Entenmuscheln. Abkürzungen: RS = Rangsumme; NK = Negativkontrolle; PK = Positivkontrolle, ROS = Reactive Oxygen Species; p-Niveau = Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Unterschiedlichlichkeit der Datenreihen; $x \le 5\%$, $xx \le 1\%$, $xxx \le 0,1\%$)

	Phagozytose- leistung in Beads pro phagozytose- aktiver Hämozyt	Phago- zytose- anteil in%	Phagozytose- leistung in Beads pro Hämozyt	ROS-Produktion der ersten 90 min in µmol H ₂ O ₂ - Radikaläquivalente	vitale Hämozytenzahl pro ml nach der Punktion	nekrotischer Hämozytenanteil nach dem Phago- zytoseansatz in %
Zulauf ind. Abw. Exp. vs. Reg.	x	xx	x	x	n.s.	n.s.
Messwertanzahl nach Exp.	20	20	20	20	5	20
Messwertanzahl nach Reg.	16	16	16	16	4	16
RS nach Exposition	301	283	294	442	18	328
RS nach Regeneration	365	383	372	224	27	338
U-Wert	91	73	84	88	3	118
p-Niveau	0,028045	0,005611	0,015544	0,021896	0,086412	0,181191
PK Reg. vs Exp.	ххх	ххх	ххх	n.s.	n.s.	n.s.
Messwertanzahl nach Exp.	24	24	24	24	6	24
Messwertanzahl nach Reg.	24	24	24	24	6	24
RS nach Exposition	357	395	348	650	43	660
RS nach Regeneration	819	781	828	526	35	616
U-Wert	57	95	48	226	14	216
p-Niveau	0,000002	0,000069	0,000001	0,201103	0,52184	0,137647
Zulauf ind. Abw. vs NK	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Messwertanzahl NK	24	24	24	24	6	24
Messwertanzahl nach Reg.	16	16	16	16	4	16
RS NK	429	497	454	545	24	528
RS nach Regeneration	391	323	365	275	31	292
U-Wert	129	187	154	139	3	156
p-Niveau	0,081984	0,890209	0,300532	0,143409	0,05501	0,32028
PK vs NK	xx	n.s.	x	n.s.	n.s.	n.s.
Messwertanzahl NK	24	24	24	24	6	24
Messwertanzahl nach Reg.	24	24	24	24	6	24
RS NK	447	526	464	597	37	536
RS nach Regeneration	729	650	712	579	41	640
U-Wert	147	226	164	279	16	236
p-Niveau	0,003645	0,201103	0,010562	0,852777	0,748774	0,283621

6.2 Statistik der Korrelationsanalysen

Tab. 22: Prüfung des Korrelationskoeffizienten r auf Signifikanz gegen Null, aus [115]. Die Nullhypothese wird zugunsten der Alternativhypothese abgelehnt, wenn |r| den für die geeignete Fragestellung, die gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit und den vorliegenden Freiheitsgrad (FG = n-2) tabellierten Wert erreicht oder überschreitet. Beispiel: Ein auf 60 FG (n = 62) basierender Wert r = 0,25 ist auf dem 5%-Niveau statistisch signifikant.

Zweiseitiger Test		Einseitiger Test				
FG	5 % [#]	1 2	0,1 %	5 %	1 %	0,1 %
1	0,9969	A*	8*	0,9877	0,9995	C*
2	0,9500	0,9900	0,9990	0,9000	0,9800	0,9980
3	0,8783	0,9587	0,9911	0,805	0,934	0,986
4	0,811	0,917	0,974	0,729	0,882	0,963
5	0,754	0,875	0,951	0,669	0,833	0,935
6	0,707	0,834	0,925	0,621	0,789	0,905
7	0,666	0,798	0,898	0,582	0,750	0,875
8	0,632	0,765	0,872	0,549	0,715	0,847
9	0,602	0,735	0,847	0,521	0,685	0,820
10	0,576	0,708	0,823	0,497	0,658	0,795
11	0,553	0,684	0,801	0,476	0,634	0,772
12	0,532	0.661	0,780	0,457	0,612	0,750
13	0,514	0,641	0,760	0,441	0,592	0,730
14	0,497	0,623	0,742	0,426	0,574	0,711
15	0,482	0,606	0,725	0,412	0,558	0,694
16	0,468	0,590	0,708	0,400	0,543	0,678
17	0,456	0,575	0,693	0,389	0,529	0,662
18	0,444	0,561	0,679	0,378	0,516	0,648
19	0,433	0,549	0,665	0,369	0,503	0,635
20	0,423	0,537	0,652	0,360	0,492	0,622
21	0,413	0,526	0,640	0,352	0,482	0,610
22	0,404	0,515	0,629	0,344	0,472	0,599
23	0,396	0,505	0,618	0,337	0,462	0,588
24	0,388	0,496	0,607	0,330	0,453	0,578
25	0,381	0,487	0,597	0,323	0,445	0,568
26	0,374	0,478	0,588	0,317	0,437	0,559
27	0,367	0,470	0,579	0,311	0,430	0,550
28	0,361	0,463	0,570	0,306	0,423	0,541
29	0,355	0,456	0,562	0,301	0,416	0,533
30	0,349	0,449	0,554	0,296	0,409	0,526
35	0,325	0,418	0,519	0,275	0,381	0,492
40	0,304	0,393	0,490	0,257	0,358	0,463
50	0,273	0,354	0,443	0,231	0,322	0,419
60	0,250	0,325	0,408	0,211	0,295	0,385
70	0,232	0,302	0,380	0,195	0,274	0,358
80	0,217	0,283	0,357	0,183	0,257	0,336
90	0,205	0,267	0,338	0,173	0,242	0,318
100	0,195	0,254	0,321	0,164	0,230	0,302
120	0,178	0,232	0,294	0,150	0,210	0,277
150	0,159	0,208	0,263	0,134	0,189	0,249
200	0,138	0,181	0,230	0,116	0.164	0.216
250	0,124	0,162	0,206	0,104	0.146	0.194
300	0,113	0,148	0,188	0,095	0.134	0.177
350	0,105	0,137	0,175	0,0878	0.124	0.164
400	0,0978	0,128	0,164	0,0822	0.116	0.154
500	0,0875	0,115	0,146	0,0735	0,104	0,138
700	0,0740	0,0972	0,124	0,0621	0,0878	0,116
000	0,0619	0,0813	0,104	0,0520	0,0735	0,0975
500	0,0505	0,0664	0,0847	0,0424	0,0600	0,0795
000	0,0438	0,0575	0,0734	0,0368	0,0519	0,0689
A* =	0,999877	В	= 0.9999	9877	C* = 0.99	99951

[#] Bei Bedarf läßt sich die 5%-Schranke durch $2/\sqrt{v+2}$ mit v = FG approximieren, z.B. v = 14, $2/\sqrt{14+2} = 0.5$.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Robert Kase, geb. 22.02.76, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig verfasst habe und alle von mir, für die Arbeit benutzten Hilfsmittel, in der Arbeit angegeben sowie die Anteile etwaig beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar gekennzeichnet habe.

Ich erkläre, dass ich die Dissertation oder Teile hiervon (sofern nicht angegeben) nicht als Prüfungsarbeit für eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Diese oder eine andere Abhandlung wurden von mir nicht an einem anderen Fachbereich oder einer anderen wissenschaftlichen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Koblenz, 07.11.2007

Robert Kase
