

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>14</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>17</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>18</b>
<b>Summary .....</b>	<b>19</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Ökotoxikologie als multidisziplinäre Wissenschaft.....</b>	<b>20</b>
1.1.1 Ökotoxikologie und die ökotoxikologischen Wirkungsebenen .....	20
1.1.2 Der chemisch numerische und der ökotoxikologische Ansatz zur Erfassung von Belastungen .....	21
1.1.3 Bedeutung der biologischen Wirkungstests und Wirkrichtungen .....	21
<b>1.2 Immunstatus und aquatische Immuntoxikologie mit Muscheln.....</b>	<b>23</b>
1.2.1 Immunstatus von Organismen und Immuntoxikologie .....	23
1.2.2 Muscheln als Modellorganismen für die aquatische Toxikologie .....	26
1.2.3 Das Immunsystem von Muscheln .....	26
1.2.4 Funktionelle Ansätze zur Messung von Immunleistungen in Muscheln.....	27
1.2.4.1 Zellvermittelte Immunantworten der Hämozyten.....	27
1.2.4.2 Humorale Immunantwort und Produktion von Reactive Oxygen Species (ROS) .....	29
1.2.5 Nachgewiesene Umwelteinflüsse auf den Immunstatus von Muscheln .....	32
<b>1.3 Vorgehensweise .....</b>	<b>35</b>
1.3.1 Erfahrungsstand zu Beginn der Untersuchungen .....	35
1.3.2 Ziele und Aufgaben .....	35
1.3.3 Durchführung und Fragestellungen der Untersuchungen .....	36
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 Mess- und Testprinzip zum durchflusszytometrischen Ansatz .....</b>	<b>39</b>
2.1.1 Messprinzip der Durchflusszytometrie .....	39
2.1.2 Testprinzip zur Messung der Phagozytoseaktivität von Immunzellen .....	41
<b>2.2 Methoden mit Säugerimmunzellen .....</b>	<b>42</b>
2.2.1 Verwendung der HL 60-Zelllinie zur Erarbeitung von Phagozytoseparametern.....	44
2.2.2 Herkunft der HL 60-Zellen .....	44
2.2.3 Kultivierung und Wachstum der HL 60-Zellen.....	45
2.2.4 Vitalitätsbestimmung von HL 60-Zellen.....	46
2.2.5 Phagozytoseansatz mit HL 60-Zellen.....	47
2.2.6 Differenzierungsstimuli für HL 60-Zellen .....	49
2.2.7 Die P388-Mausmakrophagenzelllinie.....	49

<b>2.3 Methoden der Muschelexperimente .....</b>	<b>50</b>
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 Expositionshälterung 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
<b>2.4 Methoden mit Muschelhämozyten .....</b>	<b>74</b>
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 <i>In vitro</i> -Hemmversuche mit Muschelhämozyten .....	79
2.4.5 Vorbereitung der Testansätze für die durchflusszytometrische Messung .....	80
2.4.6 Durchflusszytometrische 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
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>89</b>
<b>3.1 Ergebnisse zur Entwicklung und Validierung eines <i>In vitro</i>-Testverfahrens .....</b>	<b>89</b>
3.1.1 Ergebnisse mit den Säugerimmunzellen .....	89
3.1.1.1 Wachstum und Vitalität der HL60-Zellen .....	89
3.1.1.2 Phagozytoseaktivität von HL60-Zellen .....	90
3.1.1.3 Kinetik der Fluoreszenzzunahme durch Phagozytoseaktivität von HL 60-Zellen .....	94
3.1.1.4 Temperatureinfluss auf die Phagozytoseaktivität von HL 60-Zellen .....	95
3.1.1.5 Differenzierungsproblematik und Verwendung von P388-Mausmakrophagen .....	95
3.1.2 Hämolymphegewinnung aus Muscheln .....	96
3.1.3 Zusammensetzung der Hämolymphe .....	97
3.1.4 Punktionsfolgen .....	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 Puktion.....	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 durchflusszytometrische 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Stoffmenge im Testansatz und der Extinktion in der Phenolrotmethode .....	115
3.1.8.2 Kinetikverlauf der ROS-Produktion in Abhängigkeit von der Hämozytenzahl im Testansatz .....	116
3.1.8.3 Stimuliversuche mit der ROS-Produktion von Hämozyten.....	118
3.1.8.4 Kinetik der ROS-Produktionen von Einzelhämolymphen ohne Stimulus aus der Rheinwasserhälterung.....	119
<b>3.2 Effekte von Umweltchemikalien <i>in vitro</i>.....</b>	<b>120</b>
3.2.1 Effekte von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von P388- Mausemakrophagen ..	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 Muschelhämozyten.....	122
3.2.3 Regenerationsexperiment zur Wirkung von Schwermetallen auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten.....	125
3.2.4 <i>In vitro</i> -Effekte ausgewählter Umweltchemikalien auf die Phagozytoseleistung von Muschelhämozyten.....	126
3.2.5 <i>In vitro</i> -Effekte von Schwermetallverbindungen auf die ROS-Produktion von Muschelhämozyten.....	127
<b>3.3 <i>In vivo</i>-Effekte ausgesuchter Schwermetalle auf die Phagozytoseleistung von Entenmuscheln.....</b>	<b>128</b>
3.3.1 <i>In vivo</i> - Effekte des Methylquecksilberchlorids auf die Phagozytoseleistung von Entenmuscheln.....	128
3.3.2 <i>In vivo</i> -Effekte von Nickeldichlorid auf die Phagozytoseleistung von Entenmuscheln.....	130
3.3.3 Verlauf der Phagozytoseleistung <i>in vivo</i> ohne Referenzsubstanz .....	133
3.3.4 Bioakkumulationsergebnisse der Expositionsszenarien mit Methylquecksilberchlorid.....	134
3.3.5 Bioakkumulationsergebnisse der Expositionsszenarien mit Nickeldichlorid .....	136

<b>3.4 In vivo-Effekte von Abwasserproben .....</b>	<b>137</b>
3.4.1 Abwasserversuche mit Testsystemen für allgemein toxische Effekte .....	137
3.4.2 In vivo-Abwasserversuche mit <i>Anodonta anatina</i> zur Erfassung immunmodulierender Effekte .....	138
3.4.3 Regeneration der Immunparameter nach dreiwöchiger Laborhälterung, im Anschluss an eine zweiwöchige Abwasser- und Referenzsubstanzexposition.....	142
<b>3.5 Saisonalitäten in der Rheinwassermuschelhälterung.....</b>	<b>146</b>
3.5.1 Abiotische Faktoren der Rheinwasserhälterung .....	146
3.5.2 Biotische Faktoren der Rheinwassermuschelhälterung .....	148
3.5.3 Korrelationsanalysen der Messparameter Temperatur, Phagozytoseleistung und vitaler Hämozytenzahl für die Zeitintervalle KW 13-27; 29-41 und 43-51 .....	150
3.5.4 Vergleich zwischen den Messparametern Phagozytoseleistung und vitaler Hämozytendichte in Labor- und Rheinwasserhälterung .....	153
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>155</b>
<b>4.1 In vitro-Versuche mit Säugerimmunzellen.....</b>	<b>155</b>
<b>4.2 In vitro-Versuche mit Muschelhämozyten .....</b>	<b>156</b>
4.2.1 Phagozytoseaktivität von Muschelhämozyten.....	157
4.2.2 Gewinnung der Hämozyten .....	157
4.2.3 Adhäsionsverhalten der Hämozyten .....	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 .....	164
<b>4.3 In vivo-Laborexposition mit Entenmuscheln.....</b>	<b>167</b>
4.3.1 In vivo-Versuche mit Referenzsubstanzen.....	169
4.3.1.1 Bioakkumulation von Schwermetallen.....	171
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 <i>Anodonta anatina</i> .....	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
<b>4.4 In vivo-Frei(land)exposition mit Muscheln .....</b>	<b>181</b>
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

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