# 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).

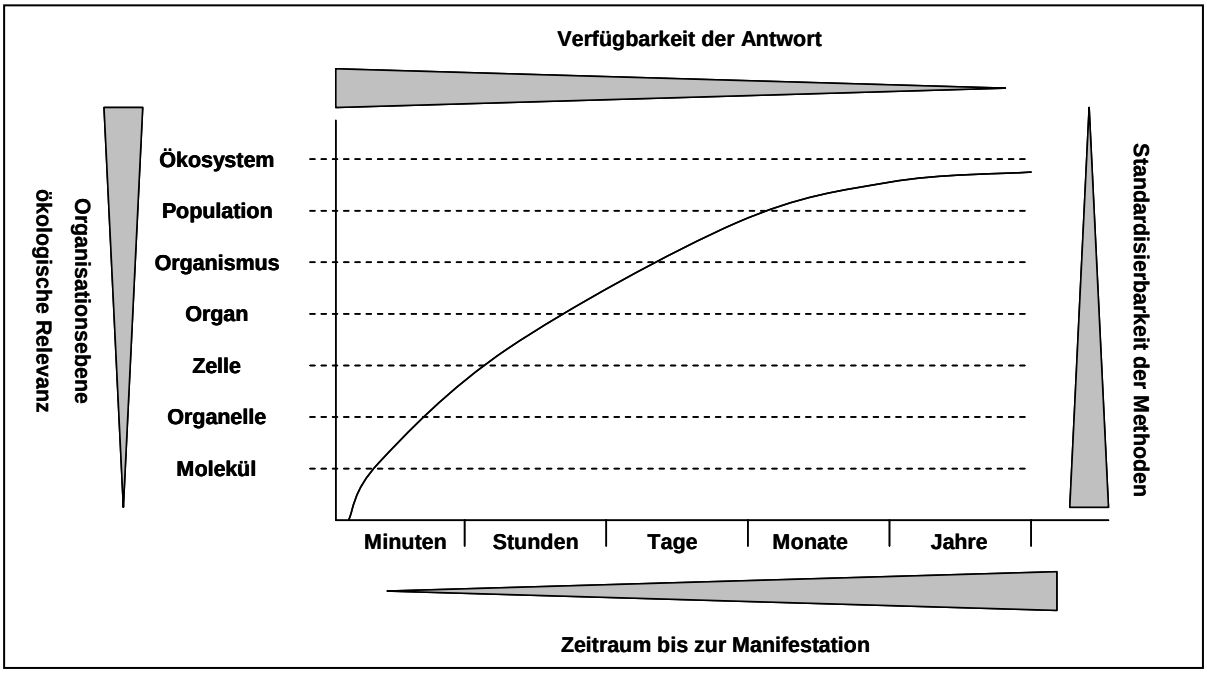


**Abb. 1:** Ebenen der ökotoxikologischen Wirkungen und mögliche Dauer der Manifestation von Effekten in Abhängigkeit der Untersuchungsmethodik; verändert nach [2].

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 Trophie- und 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].

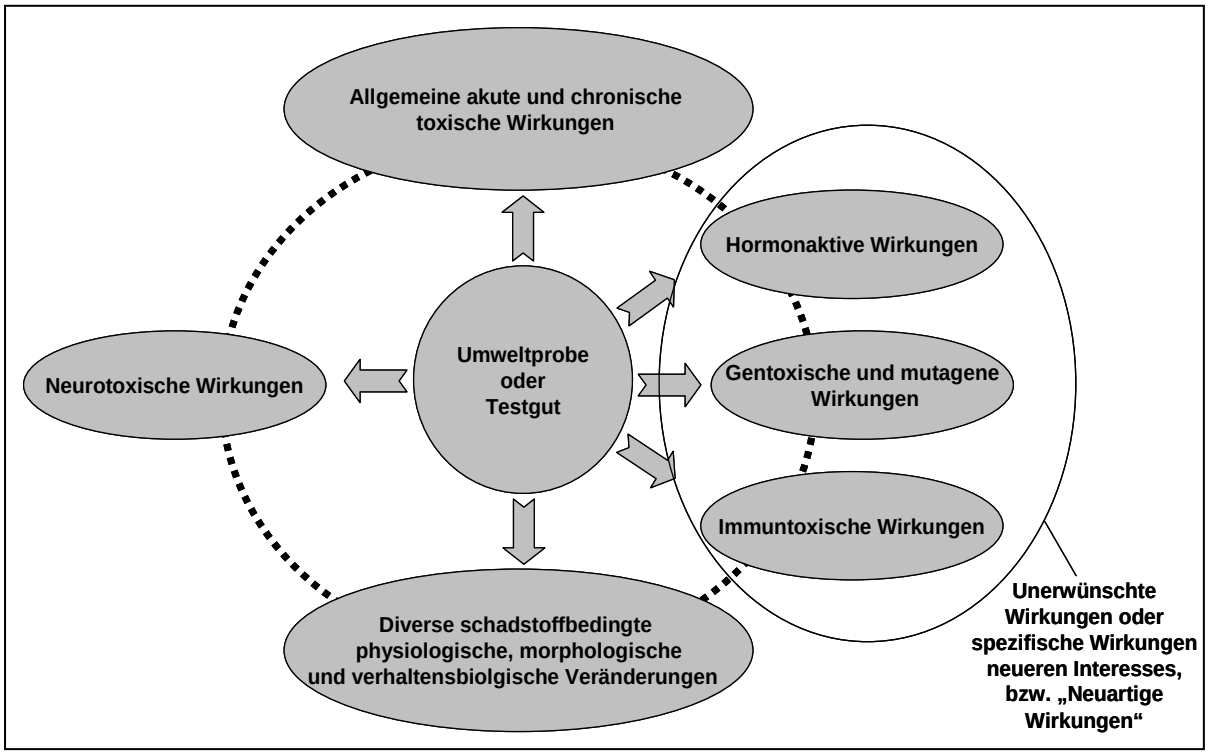


**Abb. 2:** Wirkrichtungen der Ökotoxikologie

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].

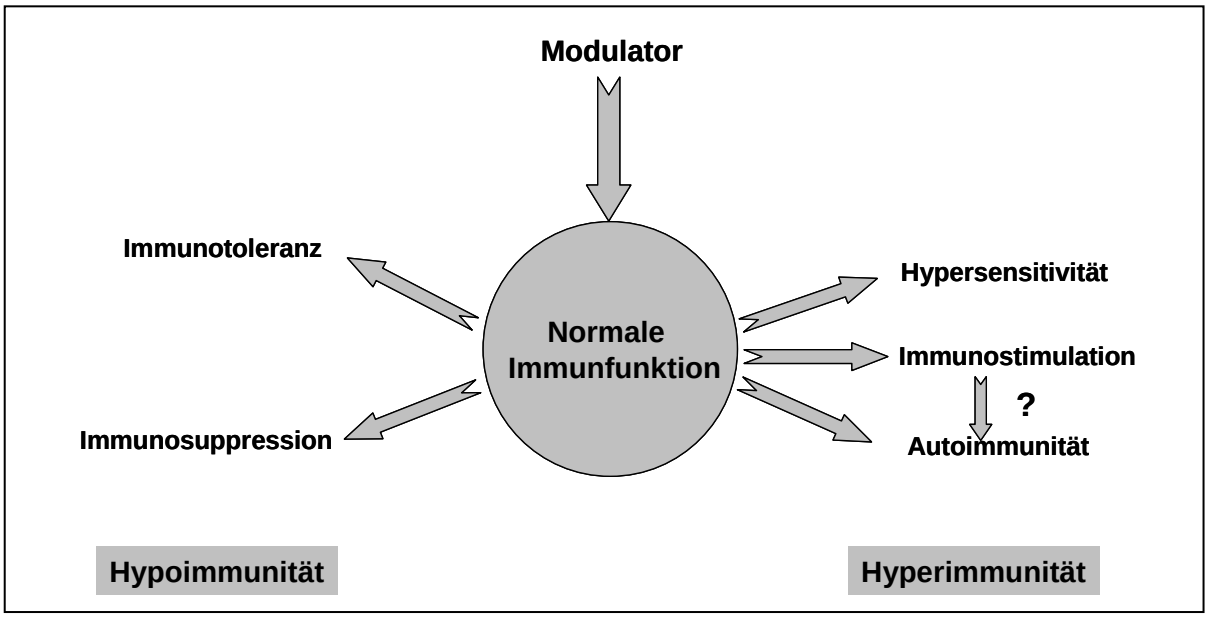


**Abb. 3:** Modell der Immuntoxikologie aus [12]

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.

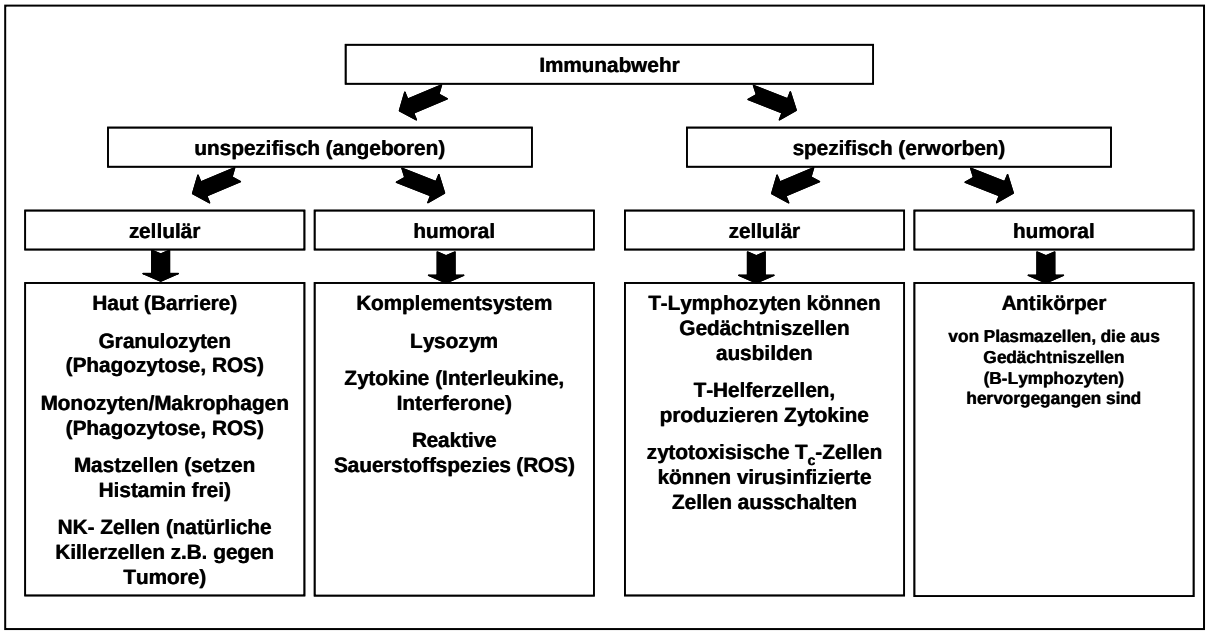


**Abb. 4:** Aufbau der Immunabwehr in Säugetierorganismen

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,<br>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.