

Aus dem Institut für Tieranatomie
Ludwig-Maximilian Universität München
Lehrstuhl für Tieranatomie II
Vorstand: *Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz*

**Untersuchungen zur Wirkung
von östrogenwirksamen Stoffen auf die Gonadenentwicklung
bei Fröschen (*Rana temporaria* und *Xenopus laevis*)
sowie ultrastrukturelle und immunhistochemische
Untersuchungen an Froschgonaden (*Rana temporaria*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

von
Cornelia Steineck
aus
Fritzlar

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

1. EINLEITUNG	5
2. LITERATURÜBERSICHT	7
2.1. Endokrin wirksame Substanzen in der Umwelt	7
2.1.1. Definitionen	7
2.1.2. Rückblick: endokrin wirksame Substanzen	7
2.2. Östrogen wirksame Substanzen in Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern ...	8
2.2.1. Alkylphenole und Alkylphenoethoxylate (APEO).....	8
2.2.1.1. Chemische Struktur	8
2.2.1.2. Physikalische und chemische Eigenschaften	8
2.2.1.3. Stoffspezifische Vorschriften	9
2.2.1.4. Produktion und Anwendung.....	9
2.2.1.5. Abbau.....	11
2.2.1.6. Umweltpräsenz	12
2.2.2. Natürliche und synthetische Östrogene	12
2.2.2.1. Chemische Struktur	12
2.2.2.2. Synthese, Halbwertszeit und Ausscheidung der natürlichen Östrogene	12
2.2.2.3. Abbau in Kläranlagen.....	13
2.2.2.4. Umweltpräsenz	14
2.3. Endokrine/ östrogene Wirkung von Alkylphenolen sowie natürlichen und synthetischen Östrogenen	14
2.4. Toxizität von Alkylphenolen und natürlichen und synthetischen Östrogenen	17
2.5. Reproduktion bei Fröschen	19
2.5.1. Morphologie und Physiologie der Gonaden.....	19
2.5.1.1. Hoden	19
2.5.1.2. Ovarien	21
2.5.2. Geschlechtsdifferenzierung und Gonadenentwicklung.....	22
2.5.2.1. Genetische Geschlechtsdetermination	22
2.5.2.2. Entwicklung der Keimdrüsen	22
2.5.2.3. Weibliche Gonade und Oogenese	24
2.5.2.4. Männliche Gonade und Spermatogenese	26
2.5.2.5. Spermiation.....	29
2.5.3. Geschlechterverhältnis	30
2.5.4. Intersexualität und Hermaphroditismus	33
2.5.4.1. Natürliche Intersexualität	33

2.6. Hyphophysen-Gonaden-Achse	34
2.6.1. Regulation der männlichen Gonade	34
2.6.2. Regulation der weiblichen Gonade	36
2.7. Äußere Einflüsse auf die Geschlechtsentwicklung.....	37
2.7.1. Temperatur	37
2.7.2. Hormone und hormonell wirksame Stoffe	38
2.8. Vitellogenese.....	40
3. MATERIAL UND METHODEN	42
3.1. Problemstellung und Projektbeschreibung	42
3.2. Exposition und Haltung	45
3.2.1. Gruppe I (Expositionsversuch)	45
3.2.1.1. Haltung und Expositionsbedingungen während des Larvenstadiums	45
3.2.1.2. Haltung und Expositionsbedingungen nach Abschluss der Metamorphose.....	48
3.2.1.3. Erfassung von Entwicklungsdaten.....	49
3.2.1.4. Wasseranalytik	50
3.2.2. Gruppe II (Wielenbach).....	50
3.2.3. Gruppe III (Zusatzgruppen).....	50
3.2.3.1. Haltungsbedingungen während des Larvenstadiums	51
3.2.3.2. Haltungsbedingungen nach Abschluss der Metamorphose	51
3.3. Untersuchungsmaterial: Organgewinnung und histotechnische Organaufbereitung ...	51
3.4. Lichtmikroskopie von Gonadengewebe.....	53
3.5. Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Vitellogenin-mRNA in vitro	54
3.6. Transmissions-Elektronenmikroskopie von Gonadengewebe	54
3.6.1. Für die Transmissionselektronenmikroskopie verwendete Reagenzien	55
3.7. Immunhistochemie an Gonadengewebe	56
3.7.1. Materialien	57
3.7.2. Durchführung	58
3.8. Toxikologische Untersuchungen-Histopathologie	59
4. ERGEBNISSE	60
4.1. Wasseranalytik des Expositionsversuches Starnberg (Gruppe II).....	60

4.1.1.	Ergebnisse der chemischen Analyse des Würmwassers	60
4.1.2.	Ergebnisse der chemischen Analyse des Abwassers	62
4.1.3.	Chemisches Abwasserprofil über 24 Stunden	65
4.2.	Bestimmung der Entwicklungsstadien bei der Gruppe I (Expositionsversuch Starnberg)	68
4.2.1.	Rana temporaria (Gruppe Ia)	68
4.2.2.	Xenopus laevis (Gruppe Ib)	71
4.3.	Lichtmikroskopie von Gonadengewebe	73
4.3.1.	Gruppe I (Expositionsversuch)	74
4.3.1.1.	Gruppe Ia: Rana temporaria – histologisches Erscheinungsbild	74
4.3.1.2.	Gruppe Ia: Rana temporaria – gonadaler Reifegrad, Geschlechterverhältnis und Transformationsprozesse	84
4.3.1.3.	Gruppe Ib: Xenopus laevis – histologisches Erscheinungsbild	88
4.3.1.4.	Gruppe Ib: Xenopus laevis – Geschlechterverhältnis und gonadaler Reifegrad	96
4.3.2.	Gruppe II: Rana temporaria (Kontrollgruppe)	99
4.3.3.	Zusatzgruppen	100
4.3.3.1.	Gruppe IIIa	100
4.3.3.2.	Gruppe IIIb	100
4.3.3.3.	Gruppe IIIc	103
4.3.3.4.	Histopathologische Untersuchung des Gonadengewebes der Zusatzgruppen	103
4.4.	Semiquantitativer Nachweis der Vitellogenin-mRNA mittels RT-PCR bei Xenopus laevis (Gruppe Ib)	105
4.5.	Histopathologische Untersuchungsergebnisse	106
4.5.1.	Histopathologische Befunde bei Xenopus laevis	106
4.5.2.	Histopathologische Befunde bei Rana temporaria	112
4.6.	Transmissionselektronenmikroskopie von Gonadengewebe	116
4.6.1.	Gruppe I und III (Rana temporaria)	116
4.7.	Immunhistochemie an Gonadengewebe	128
4.7.1.	Laminin	128
4.7.2.	SMA (Smooth Muscle Actin)	130
4.7.3.	ZP3• und ZP3•	132
4.7.4.	ACE (Angiotensin Converting Enzyme)	134
5.	DISKUSSION	137
5.1.	Charakterisierung der Gonaden	138

5.2. „Anwendungsbeispiel“ – Expositionsversuch	148
6. ZUSAMMENFASSUNG	157
7. SUMMARY	160
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	163

1. Einleitung

Seit geraumer Zeit ist weltweit ein dramatischer Rückgang von Amphibienpopulationen zu verzeichnen (Wake, 1991, Blaustein, 1994, Pelley, 1998). Zudem wurden in den USA Missbildungen bei Fröschen festgestellt (Hileman, 1998). Die Hauptursachen für den Artenrückgang sind in einer Intensivierung und Industrialisierung der Landwirtschaft, die zu einem Verlust von Laichgewässern und geeigneten Habitatstrukturen geführt hat, sowie einer stetigen Verstärkung des Straßenverkehrs, die einen vermehrten Straßentod von Amphibien zur Folge hat, zu sehen. Aber auch andere Faktoren, wie der Eintrag von Pestiziden, Kunstdüngern und anderen Chemikalien in die Umwelt tragen möglicherweise zum Rückgang dieser Tierart bei (Schlüpmann und Günther, 1996). Trotz all dieser bekannten Einflussfaktoren konnte der massive Rückgang der Amphibienpopulationen bisher noch nicht vollständig erklärt werden.

Seit einigen Jahren häufen sich Berichte über Störungen des endokrinen Systems von Mensch und Tier als Folge einer Einwirkung von Umweltchemikalien. Im Mittelpunkt des Interesses stehen dabei Stoffe mit östrogenen Wirkung. So sind zahlreiche Chemikalien dafür bekannt, oder stehen unter dem Verdacht, wie das natürliche weibliche Hormon 17 β -Estradiol zu wirken. Diese Stoffe werden als Xenoöstrogene, Pseudoöstrogene oder Umweltöstrogene bezeichnet. Zu diesen „endocrine disruptors“, die in der Umwelt vorhanden sind, gehören Alkylphenole (Nonylphenol, Octylphenol), Hydroxyanisol, Bisphenol A, DDT und seine Metabolite, Tetrachlorbiphenyl, Diethylphtalat und andere. Bisherige Untersuchungen zur Wirkung derartiger Substanzen haben sich vor allem auf Fische konzentriert. Nur wenige Studien haben bisher deren Auswirkungen auf Amphibien untersucht (Kloas und Lutz, 1997; Lutz und Kloas, 1999; Kloas et al., 1999). Dies ist im Hinblick auf den bereits erwähnten Artenrückgang und die gehäuft auftretenden Missbildungen erstaunlich. In den neuen Richtlinien zur Chemikalienbewertung im Rahmen der OECD und in den USA (EPA, Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC) werden Amphibien als wichtige Indikatororganismen zur Darstellung endokriner Wirkungen erachtet. Gegenwärtig werden im Rahmen der OECD und der amerikanischen EPA entsprechende Testsysteme diskutiert (zum Beispiel „Frog Metamorphosis Assay“ und „Amphibian Development and Reproduction Test“).

In England wurden östrogene Wirkungen auf Fische nach kurzzeitiger Exposition unterhalb von Kläranlagen und in belasteten Fließgewässern festgestellt (Harries et al., 1997). Gleichzeitig wurde in dortigen Fließgewässern das Auftreten von „Intersex-Phänomen“ bei Rotau-

gen (*Rutilus rutilus*) beobachtet, was ebenfalls auf hormonwirksame Substanzen im Abwasser zurückgeführt wurde (Jobling et al., 1998). Auch in Berliner Abwässern konnte eine östrogene Aktivität bei Fischen nachgewiesen werden (Hansen et al., 1998). Diese Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass Umweltchemikalien auch bei Amphibien eine Störung der Reproduktionsbiologie verursachen könnten und somit eine weitere Ursache für den Amphibienrückgang darstellen.

2. Literaturübersicht

2.1. Endokrin wirksame Substanzen in der Umwelt

2.1.1. Definitionen

Substanzen, die in hormonelle Regelkreise bei Mensch und Tier eingreifen können, bezeichnet man als „endocrine disrupting chemicals“. Man unterscheidet zwischen endokrinen Disruptoren, deren Wirkung in vivo nachgewiesen ist und potentiellen endokrinen Disruptoren, bei denen Hinweise vorliegen, dass diese Stoffe Auswirkungen auf das Hormonsystem haben können (UBA, 1997a). Eine Definition zuständiger EU-Gremien (European community, 1997) lautet: „An endocrine disruptor is an exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, secondary to changes in endocrine function. A potential endocrine disruptor is a substance that possesses properties that might be expected to lead to endocrine disruption in an intact organism“.

Auf Grund ihrer hohen Umweltpräsenz stehen heute Substanzen mit östrogener Wirkung im Mittelpunkt des Interesses (Gülden et al., 1997). Zu dieser Gruppe gehören sowohl naturfremde Verbindungen (synthetische Östrogene, Industrie- und Umweltchemikalien), sogenannte Xenoöstrogene, die trotz unterschiedlicher chemischer Struktur eine östrogene Aktivität aufweisen, als auch natürliche Verbindungen (endogene Östrogene, Phyto- und Mykoöstrogene).

Die meisten Xenoöstrogene wirken, wie die natürlichen Östrogene, direkt durch Bindung an Rezeptoren. Neben diesen direkten Rezeptor-vermittelten Wirkungen sind auch eine ganze Reihe indirekter (anti)östrogener Wirkungen möglich, wie z. B. Veränderungen der Anzahl von Hormonrezeptoren in den Erfolgsorganen, Beeinflussung der Biosynthese und Biotransformation von Hormonen, Störungen der Transportproteinbindung im Blutplasma sowie der endokrinen Aktivität von Hypothalamus und Hypophyse (Gülden et al., 1997).

2.1.2. Rückblick: endokrin wirksame Substanzen

Bereits in den 50er Jahren wurden durch Pestizide (DDT) hervorgerufene Massensterben u.a. bei Renntauchern (*Aechmophorus occidentalis*) am nordamerikanischen Clear Lake und bei Wanderfalken in Deutschland beobachtet (Carson, 1968; Leisewitz, 1996). Zurückgeführt wurde dies auf eine Anreicherung von DDT in der Nahrungskette. Bei den Greifvögeln

konnte außerdem eine pestizidbedingte hormonelle Störungen des Calcium-Stoffwechsels beobachtet werden. In den 80er Jahren wurde an den nordamerikanischen „Great Lakes“ ein Rückgang bei 16 untersuchten Fisch-, Vogel-, Reptilien- und Säugetierarten ausgewertet. Bei den betroffenen Tierarten, denen die Jungtiere starben oder die sich nicht mehr normal vermehren konnten, handelte es sich um in der Nahrungskette weit oben stehende Tierarten, die sich von Fisch oder fischfressenden Tieren ernähren. Weiterhin wurden in den 80er Jahren Gesundheits- und Geburtsschäden bei Kindern beobachtet, deren Mütter vor/während der Schwangerschaft Fisch aus den Great Lakes gegessen hatten. Die bei Tieren und Menschen beobachteten Schäden wurden auf eine starke Belastung der Fische mit polychlorierten Biphenylen (PCB) zurückgeführt (Colborn et al., 1990; Colborn et al., 1991). Nach einem Industrieunfall mit DDT im Jahr 1981 wurden bei Alligatoren im Lake Apopka, Florida, Veränderungen der Geschlechtsorgane, des Geschlechtshormonspiegels sowie Reproduktionsstörungen beobachtet (Guillette Jr. et al., 1994; Guillette Jr. et al., 1995; Leisewitz, 1996). Neuere Untersuchungen ergaben eine östrogene Wirkung verschiedener Industriechemikalien wie z. B. Para-Nonylphenol (Soto et al., 1991), Bisphenol A (Krishnan et al., 1993) und Phthalatester (Jobling et al., 1995; Soto et al., 1995).

2.2. Östrogen wirksame Substanzen in Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern

2.2.1. Alkylphenole und Alkylphenoethoxylate (APEO)

2.2.1.1. Chemische Struktur

Nonylphenol (NP) gehört zur Gruppe der Alkylphenole. Diese bestehen aus einem Phenolring und einer Alkylkette unterschiedlicher Länge. Das in der Industrie am häufigsten verwendete „technische Nonylphenol“ besteht zu 98 Massenprozent aus Isononylphenol und zu 2 Massenprozent aus 2,4-Dinonylphenol (BUA, 1988). Isononylphenol setzt sich aus verschiedenen verzweigten Isomeren und Homologen zusammen. Es liegt zu 90% als 4-Nonylphenol, mit der Nonylkette am Phenolring in para-Stellung, und zu ca.10% als 2-Nonylphenol, mit der Nonylkette in ortho-Stellung zur Hydroxylkette, vor.

2.2.1.2. Physikalische und chemische Eigenschaften

Nonylphenol ist eine hochvisköse (ca. 2500 mPa s), farblos bis gelblich klare Flüssigkeit mit einem schwach phenolischen Geruch. Die Dichte liegt bei 0,95 g/cm³ (20 C°), die Schmelztemperatur bei –8 C° und der Siedebereich bei 290-320 C°. Auf Grund seiner hohen Lipophi-

lität ist Nonylphenol nur sehr gering wasserlöslich (3 mg/l bei 20 C°). Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P_{ow}$ liegt bei 3,28 (pH 7). Die Wasserlöslichkeit steigt mit Zunahme der Temperatur an, bei einer Temperatur von 20,5 C° ist NP bereits in einer Konzentration von 5,4 mg/l löslich. Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient steigt bei dieser Temperatur auf $\log P_{ow}$ 4,48 (pH 7) an (Ahel und Giger, 1993b).

2.2.1.3. Stoffspezifische Vorschriften

4-NP wird im Katalog „Wassergefährdende Stoffe“ (Roth, 29 Erg. Lfg. 11/1996) der Wassergefährdungsklasse 3 (stark wassergefährdende Stoffe) zugeordnet. Gemäß der deutschen Gefahrenstoffverordnung (GefStoffV) und der entsprechenden Richtlinien gilt NP als ätzend und umweltgefährdend. Bei den Hinweisen auf besondere Gefahren gilt unter anderem Nr. 50/53 (sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern langfristig schädliche Wirkung haben); bei den Sicherheitsratschlägen wird erwähnt, dass die Freisetzung in die Umwelt zu vermeiden ist (Nr. 61).

2.2.1.4. Produktion und Anwendung

Mit Hilfe eines sauren Katalysators wird durch Umsetzung von Phenol mit verzweigten Nonen-Isomeren (Tripropylen) Nonylphenol gewonnen. Die Produktion erfolgt in geschlossenen Anlagen in einem Reaktor bei 50-150 °C. Hierbei entsteht ein Isomeregemisch das neben 4-NP auch noch kleinere Anteile von 2,4-Dinonylphenol und von 2-Nonylphenol enthält. Dieses Rohprodukt wird durch eine mehrstufige Vakuumdestillation gereinigt, wobei ca. 95-99% NP entstehen (BUA, 1988).

Alkylphenole werden als Ausgangsstoffe für die Herstellung von Alkylphenoethoxylaten (APEO) eingesetzt. Auch Nonylphenol wird in Europa zu 70-80% als Zwischenprodukt für chemische Umsetzungen mit Ethylenoxid zu den grenzflächenaktiven Nonylphenoethoxylaten (NPEO) verwendet. 10-15% des Nonylphenols kommen in einem Gemisch aus 4-NP und 2,4-NP als Antioxydants und Alterungsschutzmittel in der Kunststoff- und Kautschukindustrie oder als Zusatzstoff für Kunststoffbehälter, -verpackungen und -geschirr zum Einsatz. Unverändertes Nonylphenol wird in geringem Umfang z. B. als Hilfsstoff in Gerbereien oder als Komponente in Pestizidformulierungen in der Landwirtschaft verwendet (BUA, 1988).

Die NPEOs haben weltweit einen Produktionsanteil von 82% und sind damit die gebräuchlichsten Alkylphenoethoxylate. Weiterhin kommen Octyl- oder Butylphenoethoxylate zur Anwendung (Nimrod und Benson, 1996). Je länger die Ethylkette, umso wasserlöslicher ist

die Verbindung (Sweden, 1994). NPEOs mit bis zu 10 Ethylenoxidgruppen werden vor allem als Detergenzien, mit bis zu 30 Ethylenoxidgruppen als Emulgatoren und darüber als Dispersionsmittel eingesetzt. NPEOs kommen im Haushalt in Wasch- und Reinigungsmitteln und in der Woll-, Leder-, Papier-, Farb- und Färbeindustrie zum Einsatz (BUA, 1988). Außerdem stellen NPEOs und Octylphenoethoxylate (OPEOs) Bestandteile von Spermiziden und Kontrazeptiva dar. Viele APEOs und deren Derivate sind zudem zugelassene Ausgangsstoffe für die Herstellung von Lebensmittelbedarfsgegenständen (Bedarfsgegenstände VO, 1992). Ein Großteil der APEOs gelangt über das Abwasser in Kläranlagen, wo als stabiles Abbauprodukt u. a. der sehr viel toxischere Metabolit 4-iso-NP entsteht, welcher von dort in die Umwelt gelangt.

Weltweit beträgt die Produktion von NPEOs ca. 300.000 t jährlich, wobei ca. 100.000 t davon auf Europa entfallen (Ospar, 1994). In Deutschland werden jährlich 35.000 t NP produziert, welches wiederum zur Herstellung von NPEOs verwendet wird (Zellner und Kalbfus, 1997). In den USA beträgt der Anteil der APEOs an der Gesamtproduktionsmenge von oberflächenaktiven Substanzen 6% und der Anteil an nichtionischen oberflächenaktiven Stoffen 25% (Nimrod und Benson, 1996). Nachdem 1985 von 17.000 t in der BRD eingesetzten APEOs 12.000 t in die Abwässer gelangten (vor allem durch Haushaltswaschmittel und Reinigungsmittel), beschloss die APEO-herstellende und verarbeitende Industrie gegenüber dem Bundesministerium des Inneren der BRD 1986 eine „freiwillige Verzichtserklärung auf Alkylphenoethoxylate“. Die Rücknahme erfolgte in einer schrittweisen Reduktion aus Haushalts- und später auch aus Industriereinigungsmitteln. Ersatzweise erfolgte dann der Einsatz von abbaubaren Alkoholethoxylaten. Auch in anderen europäischen Ländern gab es Pläne für eine Reduktion des Einsatzes von APEOs. In der Schweiz wurde 1986 ein Verbot zur Anwendung von Nonyl- und Octylphenoethoxylaten in Detergenzien ausgesprochen. In Schweden erfolgte 1991 eine Vereinbarung, bis zum Jahr 2000 den Gebrauch von NPEOs vollständig einzustellen. 1992 wurden dann endgültig die Empfehlungen zum phasenweisen Abbau der Anwendung von NPEOs als „PARCOM-Recommandation 92/8“ von den Teilnehmern der OSPAR-Kommision (Oslo and Paris conventions for the prevention of marine pollution) angenommen. Diese beinhalten die Einstellung des Gebrauchs von APEOs bis 1995 in Haushaltsreinigern und bis zum Jahr 2000 in industriellen und gewerblichen Reinigern (Sweden, 1994). Die Beschlüsse werden in ganz Europa von den Herstellern von Haushaltsreinigern beachtet und erstrecken sich in einigen Ländern sogar auch auf gewerbliche und industrielle Reinigungsprodukte (CESIO, 1997).

In der Änderung der EU-Wasserrahmenrichtlinie vom 15.12.01 wurden Nonylphenol und Octylphenol in die „Liste der prioritären Stoffe“ aufgenommen. Die Emission bzw. Einleitung

dieser Substanzen muss schrittweise bis 2020 eingestellt werden (EU-Wasserrahmenrichtlinie, 2000/60/EG).

2.2.1.5. Abbau

Die Ethoxylatketten der APEOs und NPEOs werden während der aeroben Abwasserbehandlung hydrolytisch gespalten und es entstehen die Metabolite Nonylphenoldiethoxylat (NP2EO) und Nonylphenolmonoethoxylat (NP1EO). Außerdem können Teile der niedrig ethoxylierten Verbindungen zu Nonylphenoethoxyessigsäure (NP2EC) und Nonylphenoxyessigsäure (NP1EC) carboxyliert werden (Holt et al., 1991; UBA, 1997a). Der weitere Abbau erfolgt sehr langsam, da die Metabolite auf Grund ihres aromatischen Rests eine nur sehr geringe Hydrophilie aufweisen. Es kommt zu einer Adsorption an Schwebstoffpartikel und Sediment im Klärschlamm. Die darauf folgende anaerobe Stabilisierung des Klärschlammes hat einen langsamen Abbau von NP1EO und NP2EO zu Nonylphenol zur Folge (BUA, 1988; Giger et al., 1984). Die Abbauprodukte gelten dabei als deutlich toxischer für aquatische Organismen als die Ausgangsprodukte und haben zudem ein hohes Bioakkumulationspotential. Metabolite von NPEOs stellen den größten Teil der in geklärtem Abwasser nachweisbaren NP-Derivate dar (Ahel et al., 1994a). Insgesamt gelangen etwa zwei Drittel der NPEOs in Form ihrer Metaboliten in die Umwelt, der Rest wird weiter gespalten und vollständig zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut (UBA, 1997). Die Anteile der NP-Derivate, die das Klärwerk verlassen, verteilen sich folgendermaßen: 19% NPEC, 11% NP1EO und NP2EO, 25% NP und 8% NPnEO.

Da NP und seine Mono- und Diethoxylate schlecht wasserlöslich sind (NP: 5,4 mg/l, NP1EO: 3,02 mg/l und NP2EO: 3.39 mg/l) (Ahel und Giger, 1993), ist ihre Anreicherung im Sediment und Klärschlamm besonders hoch (Ahel und Giger, 1985; Giger et al., 1984; Tschui und Brunner, 1985). Über Klärschlammdüngung und Bodenerosion gelangt NP in die Gewässer. Nach Ahel et al. (1994a) enthalten aber auch primäre Kläranlagenausläufe in der Schweiz beträchtliche Mengen an NP-Derivaten, länger-kettige NPEOs werden dagegen effektiv eliminiert.

NP kann in Gewässern auch abiotisch durch Photolyse abgebaut werden, wobei die Halbwertszeit in der oberflächlichen Wasserschicht bei Mittagssonne 10-15 Stunden beträgt. In tieferen Schichten verlangsamt sich der Abbau jedoch erheblich (bei 20-25 cm Tiefe um das 1,5 fache) (Ahel et al., 1994c).

2.2.1.6. Umweltpräsenz

Von Zellner und Kalbfus (1997) durchgeführte Messungen an bayerischen Oberflächengewässern ergaben folgende Konzentrationen von NP. Unterhalb von Kläranlagen konnten je nach Bevölkerungsdichte und industrieller Struktur Werte zwischen 0,1 und 0,4 µg/l des technischen Gemisches von 4-iso-NP nachgewiesen werden. In unbelasteten Fließstrecken lagen die Werte bei 0,01 bis 0,08 µg/l. In den Jahren 1988 bis 1997 durchgeführte Messungen lagen noch um etwa 50% höher. Untersuchungen an verschiedenen deutschen Flüssen in den Jahren 1997 und 1998 ergaben NP-Konzentrationen von 0,03 bis 0,04 µg/l und unterhalb von Kläranlagenabläufen ebenfalls Werte von 0,1 bis 0,4 µg/l (Eil, 1998). Die Konzentration im Sediment liegt in Bayern bei 1-10 mg/kg und im Klärschlamm bei 5-20 mg/kg, woraus sich für NP ein Anreicherungsfaktor von 10^3 bis 10^4 ergibt (Zellner und Kalbfus, 1997).

Messungen in vier verschiedenen Kläranlagenabläufen in Baden-Württemberg ergaben für NP Werte zwischen 331 und 956 ng/l, für NP2EC Werte zwischen 1698 und 5380 ng/l. NP2EO war in zwei Kläranlagen nicht nachweisbar, in den anderen beiden Anlagen wurden Konzentrationen von 189 und 2042 ng/l gemessen (Spengler et al., 1999).

2.2.2. Natürliche und synthetische Östrogene

2.2.2.1. Chemische Struktur

Östrogene zeichnen sich durch einen aromatischen Ring A und das Fehlen der angulären Methylgruppe zwischen dem Ring A und dem Ring B des Steroidmoleküls aus. Östrogene sind also Steroide mit nur 18 Kohlenstoffatomen (Androgene besitzen 19 Kohlenstoffatome). Das wirksamste natürlich vorkommende Östrogen ist das Estradiol. Estron besitzt nur etwa ein Drittel, Östriol etwa ein Zehntel der biologischen Aktivität des Estradiols. Durch Alkyl-Substitutionen wurden beispielsweise die in der Humanmedizin eingesetzten synthetischen Derivate synthetisiert: 17α -Ethinyl-Estradiol und Mestranol (Forth et al., 1992).

2.2.2.2. Synthese, Halbwertszeit und Ausscheidung der natürlichen Östrogene

Ausgangsstoff der Steroidhormonsynthese ist Cholesterol. Ort der Biosynthese sind die Theka- und Granulosazellen im Ovar. Vorstufe der Östrogene ist Testosteron, das an C-19 oxidiert wird; Abspaltung dieses C-Atoms führt dann zur Aromatisierung des Ringes A, so dass das 17β -Estradiol entsteht.

Die Inaktivierung der Östrogene erfolgt in der Leber. Die wichtigsten Stoffwechselprodukte des 17 β -Estradiol sind Estron, 2-HydroxyEstron und 3,16 β -Östriol. 17 β -Estradiol und seine Metabolite werden in der Leber an Glucuronsäure und Schwefelsäure konjugiert und als Glucuronide und Sulfate im Harn ausgeschieden.

2.2.2.3. Abbau in Kläranlagen

Messungen von Ternes et al. (1999) über einen Zeitraum von sechs Tagen in einer Kläranlage bei Frankfurt am Main ergaben folgende Ergebnisse: Der Eintrag an Östrogenen im Rohabwasser betrug für Estron knapp über 1 g/d, für 17 β -Östrodol 0,55 g/d, für 17 β -Ethinylestradiol 0,06 g/d und für 16 β -Hydroxysteron 0,53 g/d. Die Messungen am Kläranlagenauslauf ergaben für Estron und 17 β -EthinylEstradiol keine Abnahme dieser Substanzen im Verlauf des Klärprozesses. 16 β -Hydroxysterone und 17 β -Estradiol wurden um 68% bzw. um 64% reduziert. Ähnliche Messungen in einer Kläranlage bei Rio de Janeiro, Brasilien, ergaben eine deutlich höhere Abbaurrate. Die im Rohabwasser durchgeführten Messungen ergaben folgende Ergebnisse: 5,1 g/d Estron, 2,6 g/d 17 β -Estradiol und 0,7 g/d 17 β -Ethinylestradiol. Die Abbaurrate lag für 17 β -Estradiol bei 99,9%, für Estron bei 83% und für 17 β -Ethinylestradiol bei 78%. Eine mögliche Ursache für die höheren Abbauraten könnten die höheren Außentemperaturen sein. In Frankfurt lagen die Temperaturen zum Zeitpunkt der Messungen im Durchschnitt bei 2 °C, in Brasilien bei 20 °C (Ternes et al., 1999).

Von Jürgens et al. (1998) durchgeführte Versuche zur Abbaubarkeit von Östrogenen ergaben, dass Estradiol bei Raumtemperatur unter aeroben Bedingungen innerhalb weniger Tage zu Estron oxidiert wurde während sich Ethinylestradiol als viel beständiger erwies. Unter anaeroben Bedingungen war die Oxidation von Estradiol zu Estron teilweise reversibel und alle Abbauvorgänge verliefen deutlich langsamer.

Messungen an fünf verschiedenen Kläranlagen in Baden-Württemberg ergaben für Östrogene in den Kläranlagenabläufen folgende Konzentrationen: 4 ng/l 17 β -Estradiol, 5,1 ng/l Estron, 2,0 ng/l 17 β -Ethinylestradiol und 1,0 ng/l Mestranol. Messungen der Östrogene im Rohabwasser wurden nicht durchgeführt. Weiterhin wurden biologische Tests zur Bestimmung der östrogenen Aktivität durchgeführt. So ergab der E-Screen-Assay mit östrogenrezeptorpositiven MCF-7 Brustkrebszellen einen Proliferationseffekt relativ zur Positivkontrolle mit Estradiol zwischen 45 und 48%. Das sich daraus ergebende Estradiol-Äquivalent (EEQ) bezieht sich auf den Gesamtgehalt an östrogenwirksamen Substanzen in einer Probe. Bei den untersuchten Kläranlagenabläufen ergab sich ein EEQ zwischen 2,4 und 3,3 ng/l (Medianwert: 3,3 ng/l) (Sprengler et al., 1999). Beim E-Screen-Test werden alle östrogen-wirksamen Substanzen erfasst, das heißt auch Xenoöstrogene und Phytoöstroge.

Untersuchungen von Körner et al. (1998) zum Input/Output-Verhältnis von östrogenwirksamen Substanzen in einer Kläranlage in Süddeutschland („Steinhäusle“) ergaben im Rohabwasser eine EEQ von 4,47 g/d. Im Kläranlagenauslauf lag die EEQ bei 0,49 g/d, die östrogene Aktivität wurde somit um 89% reduziert. 0,11 g EEQ/d konnten im Klärschlamm gemessen werden, was 2,8% der Input/Output-Differenz entspricht. Somit lag die Biodegradation der Gesamtheit aller östrogenwirksamen Substanzen während der Kläranlagenpassage bei 86%. Der Anteil an phenolischen Xenooestrogenen an der absoluten östrogenen Aktivität lag bei 0,7% im Rohabwasser und 4,3% im Kläranlagenauslauf.

2.2.2.4. Umweltpräsenz

Studien zur Präsenz von natürlichen und synthetischen Östrogenen kamen zu folgenden Ergebnissen. In Fließgewässern konnte vereinzelt Ethinylestradiol in Konzentrationen unterhalb von 5 ng/l nachgewiesen werden. In Kläranlagenabläufen wurden Ethinylestradiolwerte von 62 ng/l und Estradiolwerte bis 21 ng/l gemessen (Stumpf et al., 1996). In bayerischen Fließgewässern konnten bisher keine Ethinylestradiolkonzentrationen nachgewiesen werden. In Kläranlagenabläufen lagen die Werte in Einzelfällen knapp über der Bestimmungsgrenze von 0,3-0,5 ng/l und in Klärschlamm fanden sich vereinzelt geringe Mengen von 17 β -Ethinylestradiol (2-5 ng/l) (Kalbfus, 1997). Messungen von Stumpf et al. (1996) in Trinkwasserproben ergaben keine nachweisbaren Mengen von natürlichen und synthetischen Östrogenen, es konnte jedoch das Phytoöstrogen β -Sitosterol nachgewiesen werden.

2.3. Endokrine/ östrogene Wirkung von Alkylphenolen sowie natürlichen und synthetischen Östrogenen

Unter endokriner Wirkung versteht man alle Wirkungen, die in die hormonelle Regulation im Körper von Mensch und Tier eingreifen. Steroidhormone können auf Grund ihrer guten Lipidlöslichkeit, im Gegensatz zu den hydrophilen Hormonen, die Zellmembran penetrieren. In der jeweiligen Zielzelle finden diese dann das zu ihnen passende, spezifische zytoplasmatische Rezeptorprotein, mit dem sie sich verbinden. Die Hormon-Rezeptor-Bindung ist die Voraussetzung für die Hormonwirkung. Der Hormonrezeptorkomplex wandert nach seiner Bildung in den Zellkern und induziert dort, nach Bindung an Kernrezeptoren (nuklear estrogen responsive element), eine vermehrte Bildung von mRNA. Auf die gleiche Weise können östrogen wirksame Chemikalien an die Östrogenrezeptoren binden und eine ähnliche Wirkung wie Östrogene hervorrufen (Agonismus, Förderung der Genexpression), oder die Bindungsstellen blockieren und dadurch die östrogene Wirkung hemmen (Antagonismus).

Zur Zeit existieren keine standardisierten Testmethoden zur Charakterisierung der östrogenen Potenz von Chemikalien (Gülden, 1995; UBA, 1997). Im Rahmen der gegenwärtig etablierten Testverfahren (OECD-Guidelines) zur Prüfung von Umweltchemikalien finden Untersuchungsmethoden zur Erfassung endokriner Wirkungen keine Berücksichtigung. Potentiell endokrine Wirkungen können mit biologischen Methoden erfasst und charakterisiert werden. Zur Bestimmung der Östrogenität werden sowohl in-vivo, als auch in-vitro-Methoden angewendet (Übersicht: Gray et al. 1997; Gülden et al., 1997; UBA, 1997). Die in vivo-Methoden beinhalten Untersuchungen zur Wirkung auf den Genitaltrakt männlicher und weiblicher Tiere (Christiansen et al., 1998; Colerangle und Roy, 1996) sowie auf die Geschlechtsentwicklung (Gimeno et al., 1996; Gray und Metcalfe, 1997). Als In-vitro-Methoden stehen Zellproliferations- (Soto et al., 1991), Rezeptorbindungs- (White et al. 1994) und Genexpressionsstudien (Ren et al., 1997) zur Verfügung. An Hand dieser Versuche konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Nonylphenol sowohl die Fähigkeit besitzt agonistisch an den Östrogenrezeptor zu binden (Soto et al., 1991; White et al., 1994), als auch die Östrogenrezeptor-Genexpression zu beeinflussen (Ren et al., 1997). In vitro wurde die östrogene Wirksamkeit mit östrogensensitiven Brustkrebszelllinien (MCF-7 Zellen) und durch Versuche an Fisch-Hepatozytenkulturen nachgewiesen. Im E-Screen-Test (MCF-7-Zellen) lag die relative Wirkungsstärke von NP im Vergleich zu Estradiol (100%) bei 0,001% (Soto et al., 1991). Nach White et al. (1994) erfolgte eine halbmaximale Stimulation des MCF-7 Zellwachstums durch 17β -Estradiol bei Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-9} Mol, während Octylphenol erst bei 10^{-6} Mol und Nonylphenol bei 10^{-5} einen messbaren Effekt zeigten (Nagel et al., 1997). Die Fähigkeit von Alkylphenolen mit Estradiol am Östrogenrezeptor zu konkurrieren, wurde an deren Hemmungspotential gegenüber 7 nM [3 H]17 β -Estradiol in uterinem Kaninchen- und Rattenzytosol gemessen. Dabei führte NP zu einer drastischen Reduzierung der [3 H]17 β -Estradiolbindung um 75% (Nimrod und Benson, 1997). Auch an Amphibien (*Xenopus laevis*) wurde die Östrogenrezeptorbindungsfähigkeit von Alkylphenolen untersucht. Bei kompetitiven Verdrängungsversuchen von [3 H]17 β -Estradiol vom Östrogenrezeptor konnte für NP ein IC₅₀-Wert (Konzentration, bei der 50% des [3 H]17 β -Estradiol vom Rezeptor verdrängt werden) von 33.666×10^{-9} M ermittelt werden, für Octylphenol lag der Wert bei 78.320×10^{-9} M. Zum Vergleich liegt der IC₅₀-Wert für Estradiol bei 42×10^{-9} M (Kloas et al., 1999).

Als geeignetes Instrument zur Erfassung einer östrogenen Wirkung sowohl in vivo als auch in vitro hat sich die Bestimmung des Dotterproteins Vitellogenin erwiesen. Vitellogenin ist ein Phospholipoprotein mit einem hohen Molekulargewicht, das unter Östrogeneinfluss in der Leber weiblicher oviparer Wirbeltieren gebildet wird (Mommensen und Walsh, 1988; Bon et al,

1997) und unter physiologischen Bedingungen dem heranreifenden Embryo als Nahrung dient. Auch in Hepatozyten männlicher Individuen konnten Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden, die allerdings ohne endokrine Stimulation inaktiv bleiben (Lazier et al., 1985). Eine Östrogenbehandlung männlicher Fische führte ebenfalls zu einer Synthese von Vitellogenin (Idler und Campbell, 1980; Copeland et al., 1986). Aufgrund dieser Tatsache wurde der Gehalt von Vitellogenin im Plasma männlicher Fische in zahlreichen Studien als Biomarker zur Erfassung östrogenen Wirkungen herangezogen (Jobling und Sumpter, 1993; Purdom et al., 1994; Flouriot et al., 1995; Sumpter und Jobling, 1995; Ankley et al., 1998; Hansen et al., 1998). So führt eine NP-Exposition zu einer Stimulation der Vitellogeninsynthese in den Hepatozyten männlicher Regenbogenforellen sowie der entsprechenden mRNA. Eine Induktion der Vitellogenin-mRNA-Synthese konnte auch in Hepatozyten des afrikanischen Krallenfrosches nachgewiesen werden (Kloas et al., 1999).

Eine mögliche Beeinflussung des Geschlechtsapparates und der Reproduktion durch Alkylphenole wurde in zahlreichen Studien an Fischen untersucht. In Großbritannien wurde das gehäufte Auftreten hermaphroditischer Fische in Gewässern unterhalb von Kläranlagen mit der Anwesenheit von Alkylphenolen sowie natürlichen und synthetischen Östrogenen in Verbindung gebracht (Purdom et al., 1994; Jobling et al., 1997; Jobling et al., 1998; Tyler und Routledge, 1998). Nach Untersuchungen von Jobling et al. (1996) führte eine dreiwöchige Exposition männlicher Regenbogenforellen in 30 µg NP/l zu einer signifikanten Abnahme des Gonadosomatischen Index (GSI) und zu einer Hemmung der Spermatogenese. Bei juvenilen, weiblichen Tieren bewirkt die gleiche Menge NP eine Zunahme des Ovosomatischen Index (OSI) (Ashfield et al., 1998). Bei der Aquarienfischart Medaka (*Oryzias latipes*) führte eine dreimonatige Exposition in 50 µg/l ab dem Schlupf zur Ausbildung von Gonadengewebe, welches gleichzeitig männliche und weibliche Charakteristika aufwies. Ab einer Konzentration von 100 µg NP/l kam es zu einer signifikanten Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten phänotypisch weiblicher Tiere (Gray und Metcalfe, 1997). In umweltrelevanten Konzentrationsbereichen von NP konnte jedoch weder eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses noch eine Störung der Reproduktionsfähigkeit festgestellt werden (Benson und Nimrod, 1998). Eine Exposition juveniler männlicher Karpfen während der kritischen Phase der Geschlechtsdifferenzierung in 0,1-1,0 mg TPP/L (4-tert-Pentylphenol) führte zu morphologischen Veränderungen im Bereich des Hodengewebes. Es kam zur Ausbildung eines Ovidukts, einer Ovo-Testis-Bildung sowie einer verminderten Anzahl an Primordialzellen im Hodengewebe (Gimeno et al., 1996; Gimeno et al., 1997). Kaulquappen von *Xenopus laevis*, die ab dem Stadium 38/40 (Entwicklungstabelle nach Nieuwkoop und Faber, 1975) in Alkylphenolen exponiert wurden, zeigten einen signifikanten Anstieg des Anteils der Weibchen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Bei NP zeigte sich

eine Feminisierung ab einer Konzentration von 10^{-7} M, bei OP konnte bereits bei einer Konzentration von 10^{-8} ein Effekt nachgewiesen werden (Kloas et al., 1999).

Eine Beeinflussung des Steroidhormonhaushalts durch Alkylphenole wurde bisher überwiegend an Invertebraten untersucht. Eine 48 h-Exposition weiblicher Wasserflöhe (*Daphna magna*) in 25 und in 100 µg NP/l bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Ausscheidung von Glukose-konjugiertem Testosteron. Ebenfalls zu 50% gehemmt wurde die Ausscheidung von Sulfat-konjugiertem Testosteron. Die Folge war ein signifikanter Anstieg von androgenen Hormonen. Weiterhin konnte ein Anstieg von relativ unpolaren dehydroxylierten bzw. reduzierten Testosteronmolekülen beobachtet werden. Für die Androgenmetabolisierung werden jedoch hydroxylierte Testosteronmoleküle benötigt. Die zunehmende Dehydroxylierung der androgenen Substanzen führte zu einem Substratmangel und somit zu einer Unterdrückung der nachfolgenden Konjugierungsreaktionen. Die Exposition von *Daphna magna* mit Nonylphenol führte somit zu einer metabolischen Androgenisierung, welche eine verminderte Fruchtbarkeit zur Folge hatte (Baldwin et al., 1997).

Hormonelle Imbalancen infolge einer NP-Exposition wurden auch bei Fischen beobachtet. So wiesen weibliche Nachkommen NP-exponierter Regenbogenforellen erhöhte Testosteron-Konzentrationen, männliche Nachkommen hingegen erhöhte Estradiolwerte auf (Schwaiger et al. 2002).

2.4. Toxizität von Alkylphenolen und natürlichen und synthetischen Östrogenen

Alkylphenole sind aufgrund ihrer Lipophilie wesentlich toxischer als Phenole (Mc Leese et al., 1980). Die Toxizität der Alkylphenole ist abhängig von der Hydrophobie der Kettenlänge (Mc Leese et al., 1980). Alkylphenole mit 6 bis 12 Kohlenstoffatomen werden für die aquatische Fauna als hoch toxisch angesehen (Mc Leese et al., 1981). Die oberflächenaktiven NPEOs besitzen somit eine geringere Toxizität als ihre Abbauprodukte NP2EO, NP1EO und NP. Die in-vitro-Zytotoxizität nimmt bei den Alkylphenolethoxylaten mit Erhöhung der Anzahl der Ethylenoxidgruppen ab (Jobling und Sumpter, 1993).

Toxizitätsdaten von Alkylphenolen und natürlichen und synthetischen Östrogenen für Amphibien liegen in der Literatur nicht vor. Jedoch wurden einige Studien mit Fischen und anderen aquatischen Lebewesen zur akuten und subletalen toxischen Wirkung dieser Substanzen durchgeführt. Untersuchungen zur letal wirkenden Konzentration (LC50 von NP) bei Fischen ergaben für die Regenbogenforelle (*Salmo giardneri*) LC50-Werte zwischen 0,23

mg/l (Mc Leese et al., 1980b) und 0,56-0,92 mg/l (Ernst et al., 1980). Die LC50-Werte für EE2 liegen für Regenbogenforellen deutlich höher (1,6 mg/l) (Schweinfurth et al., 1997).

Subletale Wirkungen von NP wurden beispielsweise für Dickkopf-Elritzen beschrieben (Holcombe et al. 1984). Nach einer 96-stündigen Exposition in 98 µg NP/l konnte eine Gleichgewichtsstörung der Fischen beobachtet werden. Nach Exposition in 187 µg NP/l wirkten die Tiere lethargisch und zeigten Hämorrhagien und Aszites. Eine 70-tägige NP-Exposition juveniler Karpfen führte bereits bei einer Konzentration von 1 µg/l zu Verhaltensstörungen. Tiere die in 5 µg NP/l exponiert wurden, ließen massive hämatologische Veränderungen in Form einer Anämie erkennen (Schwaiger et al., 2000).

Untersuchungen zur subletal toxischen Wirkung von Estradiol (E2) ergaben bei Regenbogenforellen nach oraler Gabe von 30 mg/kg Körpergewicht folgende pathologischen Befunde: Die Tiere zeigten eine Vergrößerung von Leber, Niere und Milz. Im Vordergrund der histologischen Befunde stand eine massive Ansammlung von eosinophilem Material in den Sinusoiden von Niere, Leber und Milz, im Lumen der Nierentubuli sowie in Phagozyten. Weiterhin wurden in der Niere schwerwiegende degenerative und nekrotische Veränderungen und Hämorrhagien im Bereich der Tubuli und Glomerula beobachtet. In der Leber zeigte sich eine Hyperplasie der Hepatozyten und eine Erweiterung der Gallengänge (Herman und Kincaid, 1988). Vergleichbare Befunde wurden an Karpfen, denen eine hohe Dosis des synthetischen Östrogens Ethinylestradiol injiziert wurde, beobachtet (Schwaiger et al., 2000). Bei Zackenbarschen (*Epinephelus akaara*) wurde nach Behandlung mit 17 β -Estradiol ein deutlicher Anstieg des Hepatosomatischen Index (HSI), eine Hypertrophie der Hepatozyten sowie eine Epithelverdickung und erhöhte Schleimproduktion der Haut beobachtet (Tam et al., 1983).

2.5. Reproduktion bei Fröschen

2.5.1. Morphologie und Physiologie der Gonaden

2.5.1.1. Hoden

Die paarigen, ovoiden Hoden liegen in der Körperhöhle und sind bei adulten Fröschen von einer elastischen, fibrösen Kapsel umgeben. Sie sind mit einem kurzem Band, dem Mesorchium, an der dorsalen Körperwand befestigt. Im Mesorchium laufen die Vasa efferentia vom Hoden zur Glomerularkapsel des Genitalsegments der Nieren (Lofts, 1974). Der Hoden von geschlechtsreifen Fröschen enthält ein Konvolut von Tubuli seminiferi, die von Keimepithel ausgekleidet sind. Zwischen den Tubuli befindet sich interstitielles Gewebe, das aus Bindegewebe, Blutgefäßen und den dazwischen einzeln eingestreuten Leydig'schen Zwischenzellen besteht. In den Hoden findet die Vermehrung der Gameten und Entwicklung der Spermatozoen statt, außerdem die Synthese von Androgenen, die die saisonale Entwicklung und Aktivität der sekundären Geschlechtsorgane regulieren.

Mit Hilfe einer radioaktiven Markierung von Steroidvorstufen konnte nachgewiesen werden, dass die Hoden aus diesen Vorstufen androgene Steroide synthetisieren. Dale und Dorfmann (1967) stellten fest, dass die Hoden von *Rana catesbeiana* in der Lage sind, aus radioaktiv markiertem Progesteron Testosteron zu synthetisieren. Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass der Syntheseweg von Testosteron bei Amphibien identisch ist mit dem von Säugetieren und anderen Vertebraten, das heißt von Progesteron über 17α -Hydroxyprogesteron zu Androstendion und Testosteron verläuft (Dale und Dorfmann, 1967; Ozon, 1967; Breuer, 1969; Tajima et al., 1969). Studien an verschiedenen Froscharten stellten einen Zusammenhang zwischen den saisonalen Veränderungen des Durchmessers, der Kerngröße und dem Lipidgehalt der Leydig'schen Zwischenzellen und den saisonalen Veränderungen der androgenabhängigen sekundären Geschlechtsmerkmalen, wie der Daumenschwiele fest (*R. pipiens*, Glass und Rugh, 1944; *R. nigromaculata*, Iwasawa und Asai, 1959; *R. esculenta*, Lofts, 1964; de Kort, 1971; *R. temporaria*, Lofts et al., 1972). Histochemische Untersuchungen ergaben, dass das interstitielle Gewebe des Hodens von Fröschen stark positiv auf 5α - 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3β -HSD) reagiert, ein Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) abhängiges Enzym, das 5α - 3β -Hydroxysteroiden zu 5α - 3β -Ketosteroiden oxidiert, und in die Biosynthese von Steroidhormonen involviert ist (Samuels et al., 1951; Pearlman et al., 1954; Baillie et al., 1966).

Ultrastrukturelle Untersuchungen ergaben weiterhin, dass die Leydig'schen Zwischenzellen während der Zeit hoher Androgenproduktion reich an glattem endoplasmatischem Retikulum

und Mitochondrien vom Cristae-Typ sind, beides Eigenschaften, die charakteristisch sind für Steroidhormon-produzierende Zellen (Christensen, 1965; Christensen und Fowcett, 1966; Christensen und Gillim, 1969).

Auf die Bildung der Sertoli-Zellen aus den, die Spermienzyste umgebenden Follikelzellen, wird im Kapitel 2.5.2.4 „Spermatogenese“ näher eingegangen. Die Sertoli-Zellen dienen der Ernährung der Keimzellen und haben kontraktile und stützende Eigenschaften (Lofts, 1974). Es gibt außerdem Hinweise dafür, dass diese ebenfalls die Fähigkeit zur Steroidsynthese besitzen. Brökelmann (1964) weist darauf hin, dass die Sertoli-Zellen die ultrastrukturellen Eigenschaften einer steroidsynthetisierenden Zelle besitzen. Weiterhin konnten 3 β -HSD und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kurz vor Beginn der Laichsaison nachgewiesen werden (van Oordt und Brands, 1970). Wie im benachbarten Interstitium konnte eine zyklische Veränderung der Menge an cholesterolhaltigen Lipideinschlüssen festgestellt werden (Lofts, 1964, 1968). Bei *Rana temporaria* sind die Sertoli-Zellen in den Wintermonaten frei von sudanophilem Material und Cholesterol, zeigen jedoch in dieser Zeit in der Basalregion zahlreiche Glykogeneinschlüsse (Lofts et al., 1972). Kurz vor Beginn der Laichsaison bekommen die Zellen glanduläre Eigenschaften und die Zahl an Lipidtröpfchen im Plasma nimmt deutlich zu. Der Glykogengehalt der Zellen hat deutlich abgenommen. Weiterhin kommt es zu ultrastrukturellen Veränderungen, das endoplasmatische Retikulum ist stark ausgeprägt und zahlreiche Mitochondrien mit einer elektronendichten Matrix werden sichtbar (Brökelmann, 1964). Bevor die Spermien die Zyste verlassen, bekommen die Sertoli-Zellen eine längliche Form und sind stark lipoidal. Sie lösen sich aus dem Tubulusepithel und sammeln sich zentral im Lumen der Tubuli seminiferi. Diese degenerierten Zellen sind reich an Cholesterol und saurer Phosphatase, sind jedoch 3 β -HSD negativ und die mitochondriale Matrix ist nicht mehr elektronendicht, das heißt, die Sertoli-Zelle hat zu diesem Zeitpunkt die Eigenschaften einer steroidsynthetisierenden Zelle verloren (Lofts, 1964)

Bei *Rana esculenta* wurden ebenfalls umfangreiche histochemische Untersuchungen zu dieser Fragestellung durchgeführt. Im Gegensatz zu *Rana temporaria* enthalten die Tubuli seminiferi Sertoli-Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien. Es kommt nicht zu einem synchronen Ablösen aller Sertoli-Zellen einer Generation von der Tubuluswand wie bei *Rana temporaria*, sondern immer nur einzelne Zellen erreichen dieses Stadium (Lofts, 1964). Dieselben Beobachtungen konnten beim afrikanischen Krallenfrosch gemacht werden.

Nach der Paarung verbleiben die Tubuli einige Monate in diesem Stadium, bevor es zu einer raschen Ausscheidung des cholesterolhaltigen Materials kommt. Gleichzeitig kommt es zu einem Wiederaufleben der spermatogenetischen Aktivität. Zu diesem Zeitpunkt werden die Tubuli mit einer neuen Generation Sertoli-Zellen ausgestattet, die vorherige sudanophile

Generation ist vollständig abgebaut. Spermatogenetische Aktivität und Sudanophilie der Tubuli verhalten sich in ihrem Auftreten umgekehrt proportional.

2.5.1.2. Ovarien

Nach Lofts (1974) sind die Ovarien der Amphibien paarige, sackähnliche Gebilde, die einen Hohlraum bilden. Die Wand ist in einzelne Felder eingeteilt und besteht aus einer schmalen Rindenregion, bedeckt von Keimepithel. Amphibien sind vorwiegend ovipar. Kurz vor dem Einsetzen der Laichsaison nehmen die Ovarien fast die ganze Körperhöhle ein und machen 15% des Körpergewichts aus. Die Eier werden in die Körperhöhle abgegeben und über die paarigen Eileiter zur Kloake befördert. Die Eier werden in das Laichgewässer abgegeben und von den männlichen Tieren befruchtet. Nach dem Ablaichen bilden sich die Ovarien wieder zurück und das Gewicht reduziert sich ca. auf ein Zehntel (March, 1937).

Durch Versuche mit ovariektomierten Tieren konnte gezeigt werden, dass die Synthese und Sekretion der weiblichen Geschlechtshormone in den Ovarien stattfindet und die Entwicklung und funktionelle Aktivität der sekundären Geschlechtsorgane hiervon abhängt (Dodd, 1960; Barr, 1968). Diese These konnte durch biochemische und histochemische Untersuchungen gestützt werden. Die Enzyme 3β - und 17β -HSD konnten in den Ovarien von Anuren identifiziert werden (in *Xenopus laevis*; Redshaw und Nicholls, 1971) und Estron, 17β -Estradiol und Östriol wurden aus den Ovarien von *Xenopus laevis* (Gallien und Chalumeau-Le Foulgoc, 1960; Nicholls, 1971) und *Rana temporaria* (Cedard und Ozon, 1962; Ozon und Breuer, 1964) isoliert. In *P. waltii* wurde ein 17β -Estradiolspiegel im Plasma von $0,06 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ gemessen (Ozon et al., 1971). Außerdem konnte ein östrogenbindendes Protein isoliert werden, dessen Bindungskapazität sehr viel höher ist als die von humanen östrogenbindenden Proteinen. Bei *Xenopus laevis* konnte die Steroidbiosynthese durch die Gabe von exogenen Gonadotropinen (pregnant mare's serum gonadotropin) gesteigert werden, das heißt, dass auch bei Amphibien die Adenohypophyse die ovariellen Funktionen reguliert (Ozon, 1967). Östriol kann außer in den Sommermonaten das ganze Jahr über im Plasma nachgewiesen werden, 17β -Estradiol ist nur kurz vor Beginn der Laichsaison im Frühjahr nachweisbar (Polzonetti-Magni et al., 1970).

2.5.2. Geschlechtsdifferenzierung und Gonadenentwicklung

2.5.2.1. Genetische Geschlechtsdetermination

Bei den meisten Amphibien war es bisher nicht möglich, die Geschlechts-Chromosomen morphologisch von anderen Chromosomen zu unterscheiden. Trotzdem konnte in zahlreichen Versuchen gezeigt werden, dass die Geschlechtsentwicklung genetisch kontrolliert wird. Hillis und Greene (1990) gehen davon aus, dass die fehlende morphologische Unterscheidbarkeit ein Hinweis darauf ist, dass im Vergleich zu anderen Vertebraten nur ein kleinerer Chromosomenabschnitt für die Geschlechtsentwicklung verantwortlich ist.

Viele Versuche dienten dazu, festzustellen, welches der Geschlechter homolog bzw. heterolog ist. Unter anderem wurden Rückkreuzungsversuche von geschlechtsumgewandelten Tieren mit normalen Individuen durchgeführt, um aus dem resultierenden Geschlechterverhältnis auf den Genotyp zu schließen. Zum Beispiel entwickeln sich Larven von *Xenopus laevis* zu 100% zu phänotypisch weiblichen Individuen, wenn diese mit exogenen Östrogenen behandelt werden (Witschi und Allison, 1950) (siehe Kapitel 2.11.2). Wenn diese Tiere die Geschlechtsreife erreicht haben und mit normalen Männchen gekreuzt werden, produzieren annähernd 50% der Weibchen 100% männliche Nachkommen. Somit konnte gezeigt werden, dass bei *Xenopus laevis* die Weibchen heterolog und die Männchen homolog sind (Mikamo und Witschi, 1964). In ähnlichen Studien mit *Rana* spp. wurden Larven mit Androgenen behandelt, was zu 100% phänotypisch männlichen Tieren führt (Kawamura und Yokota, 1958; Richards und Nace, 1978). Bei Rückkreuzung mit normalen weiblichen Individuen produzieren 50% der Männchen 100% weibliche Nachkommen. Bei Raniden sind demnach die Weibchen homolog und die Männchen heterolog.

2.5.2.2. Entwicklung der Keimdrüsen

Die Entwicklung der Keimdrüsen wurde bei verschiedenen Froscharten untersucht. Sie ist charakterisiert durch eine mehrphasige Organogenese. Diese gliedert sich in drei Phasen: die extragonadale Phase, die indifferente Phase und die Phase der sexuellen Differenzierung (Weirich, 1994).

1. Extragonadale Phase: Die extragonadale Phase umfasst die Einwanderung der Urkeimzellen in die Gonadenanlage. Diese entstammen bei Froschlurchen (Anura) dem dorsalen Entoderm (Lofts, 1974). Dieser Entwicklungsabschnitt reicht bei *Rana temporaria* bis in das Stadium 15 der Larvalphase (Weirich, 1994; Stadienbestimmung an Hand der von Hertwig

und Schneider 1989 überarbeiteten Normentabelle von Kopsch (1952). Dieses Larvenstadium ist charakterisiert durch die Anwesenheit äußerer Kiemen und eine freie Beweglichkeit.

2. Indifferente Phase: Die daran anschließende indifferente Phase ist charakterisiert durch die Vermehrung der Urkeimzellen und die Gliederung der Gonadenanlage in Rinde und Mark (Lofts, 1974; Weirich, 1994). Diese Bereiche sind durch die primäre Gonadenhöhle, welche relativ undifferenzierte Mesenchymzellen enthält, voneinander getrennt (Lofts, 1974). Bei *Rana temporaria* erstreckt sich diese Entwicklung vom Larvenstadium 15 bis zum Kaulquappenstadium 18 (Weirich, 1994) und ist charakterisiert durch das Auftreten von Guaninkristallen in der Epidermis und das Auswachsen der Hintergliedmaßen. Weirich (1994) schlägt vor, das indifferente Stadium zu untergliedern, da hier sehr viele Wachstums- und Differenzierungsprozesse stattfinden.

2.1 Phase des dotterreichen Genitalstranges: Die Genitalleiste ist bei *Rana temporaria* ventromedial der Kardinalvenen, bzw. in selber Lagebeziehung zu der sich entwickelnden Vena cava, deutlich zu erkennen (Weirich et al., 1993). Die Urkeimzellen sind noch mit Dotterplättchen ausgefüllt und von Zellen des Peritonealepithels umgeben. Die beiden Anteile der paarigen Anlage werden durch das dorsale Mesenterium getrennt (Weirich, 1994). Untersuchungen an anderen Froscharten kamen zu entsprechenden histologischen Befunden (Gaupp, 1904; Swingle, 1926; Christensen, 1930; Witschi, 1956; Nieukoop und Faber, 1956; Lofts, 1974; Tanimura und Iwasawa, 1988; Lopez 1989; Tanimura und Iwasawa, 1989, 1991; Kumakura und Iwasawa, 1992).

2.2 Phase der Bildung der indifferenten Gonadenanlage: Der Dotter in den Keimzellen und somatischen Zellen wird abgebaut, gleichzeitig beginnt die Vermehrung dieser Zellen. Durch das Wachstum der somatischen Zellen im Zentrum der Gonadenanlage werden die Keimzellen zur Peripherie gedrängt. Durch diesen Prozess kommt es zu einer Unterteilung des Genitalstrangs in Rinde und Mark (Weirich, 1994). Auch in anderen Untersuchungen wurde diese Entwicklung beschrieben (Gaupp, 1904; Swingle, 1926; Christensen, 1930; Witschi, 1956; Nieukoop und Faber, 1956; Lofts, 1974; Tanimura und Iwasawa, 1988, 1989, 1991; Kumakura und Iwasawa 1992). Mit der mitotischen Vermehrung von Keimzellen kommt es zur Bildung von Keimzellnestern, d. h. die Einhüllung von einzelnen oder mehreren Keimzellen durch somatische Zellen. Noch nicht geklärt ist der Verbleib der Präfollikularzellen bei männlichen Tieren. Witschi (1956) beschreibt Keimzellnester im frühen Stadium der Hodenentwicklung. Weirich (1994) konnte diese charakteristischen Keimzellnester jedoch nur in der indifferenten Gonade nachweisen. Im prospektiven Hoden des folgenden Stadiums konnten weder diese noch morphologische Anzeichen eines Degenerationsprozesses beobachtet werden.

Wie für alle höheren Vertebraten charakteristisch, entwickelt sich auch bei den Froschlurchen (Anura) nur der mittlere Teil des Genitalstrangs zur Gonade. Der kraniale Teil, die Progonade, entwickelt sich zum Fettkörper. Die Epigonade bleibt rudimentär und nimmt schließlich den Charakter des Mesenteriums an.

3. Phase der sexuellen Differenzierung: Es ist bisher keine strukturelle Veränderung beschrieben, welche als einziges allgemeingültiges Merkmal für die sexuelle Differenzierung dient. Weirich (1994) nennt für *Rana temporaria* das Auswachsen der Rinde im sich entwickelnden Ovar, die Größe der frühzeitig in die meiotische Prophase eintretenden Oozyten und die damit verbundene Größenzunahme der gesamten Organanlage gegenüber dem wachsenden Hoden. Das Wachstum von Rinde oder Mark und die gleichzeitige Reduktion des jeweils anderen Gewebes werden auch von Lofts (1974) als erstes morphologisches Kennzeichen einer sexuellen Differenzierung bei Fröschen genannt. Für *Xenopus laevis* wurde die Ausprägung eines zentralen Lumen als Hinweis für ein sich entwickelndes Ovar beschrieben (Al-Muktahr und Webb, 1971, zitiert nach Lopez, 1989). Ijiri und Egami (1975) nennen als Kriterien zur Geschlechtsbestimmung bei *Xenopus laevis* die erhöhte Anzahl der Keimzellen im sich entwickelnden Ovar im Vergleich zur Hodenanlage und die Veränderung der Kernform in der Meiose. Nieukoop und Faber (1956) nennen für diese Froschart die Wanderung der PräspERMATOGONEN als ersten Hinweis für die Ausbildung eines Hodens. Diese Beobachtung wurde auch bei anderen Froscharten gemacht (Swingle, 1926 – *Rana catesbeiana*; Christensen, 1930 – *Rana pipiens*). Tanimura und Iwaswa (1989, 1991, 1992a, b, 1993) zeigten für mehrere Anuren, dass eine höhere auf die Medulla beschränkte Zellteilung zur Ausbildung eines Hoden führt, eine gleich bleibende Zellteilung in Rinde und Mark zur Ausbildung eines Ovars.

2.5.2.3. Weibliche Gonade und Oogenese

Unter Oogenese versteht man die Transformation von Oogonien zu Oozyten (Lofts, 1974). Die Oogonien teilen sich mitotisch und man spricht von einer primären Oozyte, wenn die Prophase der ersten Reifeteilung (Reduktionsteilung) beendet ist. Die Zellen treten aber nicht in die Metaphase ein, sondern verbleiben zunächst im Diplotänstadium. Während diesem und dem darauf folgenden Stadium finden die Wachstums- und Reifungsprozesse der Oozyte statt. Bei Beendigung der ersten meiotischen Teilung, bei Anuren kurz vor dem Aufreißen der Follikularhülle, entsteht eine sekundäre Oozyte und ein kleines nicht funktionsfähiges Polkörperchen. Aus der im Anschluss stattfindenden meiotischen Teilung (Äquationsteilung) entsteht das endgültig befruchtungsfähige Ovum und wiederum ein Polkörperchen.

Bei vielen Vertebraten finden Reduktionsteilungen nur im Embryo statt, so dass nach der Geburt keine Oogonien mehr zu finden sind. Somit sind die adulten Ovarien nur mit einer bestimmten Anzahl an Oozyten ausgestattet, die bis zur Sprungreife gelangen können (Franchi et al., 1962). Bei Amphibien hingegen findet man sowohl bei Larven (Jurand, 1957) als auch bei adulten Tieren (Witschi, 1929; Christensen, 1930) teilungsfähige Oogonien, so dass immer wieder neue Generationen von Oozyten gebildet werden können. Foote und Witschi (1939) konnten bei Versuchen mit *Rana clamitans* zeigen, dass bei einer phänotypischen Umwandlung des Geschlechts, Oogonien zu Spermatogonien transformiert werden können.

Die Oozytenentwicklung kann nach Lofts (1974) in mehrere Stadien eingeteilt werden. Im Frühstadium, in welchem das Auftreten der ersten Oozyten beobachtet werden kann, haben diese einen Durchmesser von 30 – 50 μm und sind von einer einschichtigen Lage flacher Follikelzellen umgeben. Der Kern, dessen Durchmesser im Vergleich zum Zelldurchmesser relativ groß ist, enthält viele Nukleoli, die sich basophil färben und peripher zu liegen kommen. Das Zytoplasma ist fein granuliert. Die in geringer Anzahl vorhandenen Mitochondrien liegen in kleinen Gruppen eng der Kernmembran an. Außerdem sind zahlreiche kleine Vesikel zu sehen, die möglicherweise Teile eines glatten endoplasmatischen Retikulums darstellen sowie kleine Golgikörper.

An das Frühstadium schließt sich die primäre Wachstumsphase oder auch previtellogene Phase an. Während dieser Phase kann sich der Durchmesser bis auf das zehnfache vergrößern und im Zytoplasma wird der Dotterkern sichtbar. Im Vergleich zur Größenzunahme der Oozyten bleiben die Follikelzellen relativ klein mit wenig Zytoplasma und nur einigen Organellen. Für dieses Stadium ist es außerdem typisch, dass sich die Follikelzellen stark überlappen und somit zunächst keine interzellulären Zwischenräume vorhanden sind. Sowohl auf der Oberfläche der Oozyten, dem Oolemm, wie auch von den Follikelzellen werden Mikrovilli gebildet. Das Wachstum des Oozyten-Follikel-Komplexes und die Längenausdehnung der Mikrovilli führen zu immer größer werdenden Zwischenräumen zwischen Oozyt und Follikel. Diese Lücken werden dann zum Teil von Desmosomen überbrückt. Desmosomen sind Haftverbindungen, in deren Bereich der Interzellularspalt breiter als in anderen Bereichen und mit einem mikrofibrillärem Kittmaterial gefüllt ist. Die Follikelzellen mit ihren Fortsätzen sind für die Ernährung der Oozyten zuständig (Hope et al., 1963). Wallace et al. (1970) zeigten, dass bei vollständigem Entfernen der Follikularschicht, die Fähigkeit der Oozyten, Vitellogenin aufzunehmen, verloren geht.

Die anschließende sekundäre Wachstumsphase oder vitellogene Phase ist charakterisiert durch die Akkumulation von Dotter im Zytoplasma der Oozyten. Zu Beginn dieser Phase wölben sich die Follikelzellen in die Ovarialhöhle vor und es lassen sich elektronenmikroskopisch drei Zellschichten unterscheiden (Kemp, 1956; Wartenberg, 1962; Hope et al., 1963; Wischnitzer, 1964; Kessel und Panje, 1968; Joly und Picheral, 1972). Die äußerste Hülle der Oozyte ist eine Epithelschicht und geht in Grenzbereichen in das Ovarialepithel über. Die darunter liegende Bindegewebsschicht enthält die Blutkapillaren, die wie ein Netzwerk die Oozyte umgeben. Der Durchmesser der Kapillaren nimmt gleichzeitig mit dem Auftreten von Dottervesikeln in der Eizelle zu. Diese gesteigerte Durchblutung wird induziert durch Gonadotropine (Nicholls, 1969) und führt zu vermehrtem Anfluten von Nährstoffen. Das Follikelepithel bildet die innerste der drei Schichten. Die Vitellinmembran wird ebenfalls in dieser Phase sichtbar. Diese besteht aus Mukopolysacchariden, die vermutlich von den Follikelzellen sezerniert werden (Raven, 1961). Diese Membran befindet sich zwischen der Eizelle und den Follikelzellschichten. Fortsätze aus den Epithelzellen erstrecken sich in die Vitellinmembran und können sogar in die Eizelle eindringen. Ebenfalls ragen Mikrovilli von der Eizelloberfläche in die Vitellinmembran hinein. Diese Strukturen führen zu diesem Zeitpunkt zu einer engen Verbindung zwischen der Eizelle und den sie umgebenden Zellschichten. Im Vergleich zu den bisherigen Phasen, wo sich die Follikelzellen in ihrer Größe kaum verändert haben, findet in der vitellogenen Phase eine starke Größenzunahme statt. Elektronenmikroskopisch sind jetzt auch zahlreiche Mitochondrien und rauhes endoplasmatisches Retikulum zu erkennen.

Am Ende der vitellogenen Phase hat der Durchmesser der Oozyten sich wiederum mindestens verzehnfacht und sie erreichen nun die statische Phase, die von variabler Dauer ist. Bei Arten, die im Frühjahr laichen, kommen die previtellogenen Follikel im Anschluss an die Laichperiode in die vitellogene Phase. Diese ist im Herbst abgeschlossen und die Follikel kommen im Frühjahr des nächsten Jahres zur Ovulation. Smith et al (1968) zeigten jedoch mittels Isotopen und Autoradiographie, dass auch während der Winterruhe eine geringe Proteinsynthese stattfindet.

2.5.2.4. Männliche Gonade und Spermatogenese

Die Hoden der Frösche sind vom zystischen Typ (Lofts, 1968), d.h. die Entwicklung der Keimzellen findet in Gruppen statt, wobei alle Zellen einer Gruppe das gleiche Stadium haben. Jede Gruppe ist bis zum Ende ihrer Entwicklung von einer genau definierten Membran umgeben und bildet somit die sogenannte Keimzyste.

Während der Embryonalphase sind die primordialen Keimzellen, die sich in den Keimsträngen befinden, von flachen Zellen mesenchymalen Ursprungs umgeben (Champy, 1913; Witschi, 1914; zitiert nach Lofts, 1974). Diese Zellen bilden später die Wand der Keimzyste und werden auch als Follikelzellen bezeichnet. Der Kern dieser Zellen ist klein, dunkel und hat oft eine halbmondförmige Struktur. Im Gegensatz dazu sind die Kerne der primären Spermatogonien sehr viel größer und unregelmäßig geformt. Der Feinbau der Follikelzellen zeigt in diesem Stadium noch keine glandulären Merkmale, wie sie in späteren Reifungsstadien zu beobachten sind. Sie ähneln eher Fibroblasten mit nur schwach entwickeltem endoplasmatischem System und wenigen Mitochondrien (Lofts, 1974).

Die primären Spermatogonien, auch Stamm-Spermatogonien oder Protogonien genannt, haben die größten Zellkerne der gesamten Keimzellgeneration und sind eosinophil. Diese beginnen sich nun zu teilen, und es bilden sich in der spermatogenetisch inaktiven Zeit zwei völlig voneinander unabhängige primäre Spermatogonien, die beide vollständig von Follikelzellen umgeben sind. In der spermatogenetisch aktiven Phase teilen sich die Zellen mehrmals und bilden eine Gruppe aus Spermatogonien, die gemeinsam mit der umgebenden Membran und den Follikelzellen eine Keimzyste bilden. Diese Keimzysten enthalten, abhängig von der Zahl der mitotischen Teilungen, zwei oder mehr Zellen, die jetzt als sekundäre Spermatogonien bezeichnet werden. Im Unterschied zu den Stammzellen sind die sekundären Spermatogonien kleiner, die Nuklei haben eine periphere Lage und die Zellen sind basophil (Lofts, 1974).

Das Auftreten von sekundären Spermatogonien kennzeichnet den Beginn der Multiplikationsperiode (Lofts, 1974). Nach Witschi (1924) können in dieser Phase über acht Zellteilungen stattfinden, d. h. aus einem Spermatogonium kann am Ende dieser Phase eine Zyste mit mehr als 250 Spermatogonien entstehen. Bei Tieren mit innerer Befruchtung entstehen aus einem primären Spermatogonium nur bis zu 25 sekundäre Spermatogonien, die sich weiter zu Spermatozyten entwickeln (Lofts, 1968).

Van Oordt (1956) unterteilt die Multiplikationsperiode bei *Rana temporaria* in eine frühe und eine späte Phase. In der frühen Phase enthalten die Keimzysten weniger als zehn sekundäre Spermatogonien und in der späten Phase mehr als zehn, die stärker basophil sind und nur sehr wenig Zytoplasma enthalten. Nach der letzten Multiplikationsteilung vergrößert sich der Durchmesser der Zellen und die Zellen werden eosinophil, sie entwickeln sich zu primären Spermatozyten.

Die Umwandlung der Spermatogonien in primäre Spermatozyten markiert den Beginn des Reifungsprozesses. Weiterhin kann man in den Nuklei der Zellen Nukleoli erkennen, was ebenfalls auf den Beginn der Reifungsperiode hindeutet (Witschi, 1924). In dieser Phase kommt es auch zu deutlichen histologischen und ultrastrukturellen Veränderungen der Follikelzellen. Die Follikelzellen entwickeln sich zu einem glandulären Zelltyp, d. h. sie werden reicher an Zytoplasma, es werden Glykogengranula sichtbar und die Mitochondrien werden zahlreicher. Bei Tieren mit durchgehender Spermatogenese werden das ganze Jahr über neue sekundäre Spermatogonien und Spermatozyten gebildet, bei Rassen, wie zum Beispiel *Rana temporaria*, mit diskontinuierlicher Spermatogenese verlieren die primären Spermatogonien ihre Teilungsfähigkeit am Ende dieser Phase. Die primären Spermatozyten teilen sich und reifen zu sekundären Spermatozyten. Die sekundären Spermatozyten sind sehr viel kleiner als die primären. Das Zytoplasma ist eosinophil, das Kernchromatin basophil. Diese teilen sich wiederum und reifen zu Spermatiden. Die Interzellularvakuolen, welche am Anfang der Reifungsperiode sichtbar werden, nehmen an Größe zu und fließen schließlich zu einer zentralen Vakuole zusammen. Dadurch wandelt sich die Zyste in eine hohle Blase, an deren Rand sich die Spermatiden befinden. Diese frühen Spermatiden sind kleiner als die Spermatozyten und haben eine kugelige Gestalt. Die Spermatiden beginnen jetzt, an Länge zuzunehmen und formen sich um in Spermatozoen. Dieser Umformungsprozess wird Spermio-genese oder Spermiohistogenese genannt. Während dieser Phase unterziehen sich die Follikelzellen einer deutlichen Veränderung und bekommen die histologischen Charakteristika einer sekretorischen Zelle. Der Zellkern wird größer und nimmt eine kugelige Gestalt an. Im Zytoplasma werden zahlreiche Glykogengranula sichtbar. Das endoplasmatische Retikulum ist stark ausgeprägt und die Anzahl der Mitochondrien steigt. Wenn das Schwanzfilament der Spermatiden zu wachsen beginnt, reißt die Zystenwand auf und die umgebenden Follikelzellen stoßen direkt an die Wand der umgebenden Tubuli seminiferi. Jede Follikelzelle wird von einem Bündel Spermatiden umgeben, die ihre Köpfe in das Zytoplasma der Follikelzelle eingebettet haben (Lofts, 1974). In diesem Stadium enthält das Zytoplasma der Follikelzellen ein unregelmäßiges glattes endoplasmatisches Retikulum und die Charakteristika einer Säugetier-Sertolizelle (Brökelmann, 1964; Burgos und Vitale-Calpe, 1967).

In den meisten Klimazonen ist die Produktion von Spermatozoen auf eine bestimmte Periode im Jahr beschränkt, nur in tropischen und subtropischen Gebieten, wo es keine großen jahreszeitlichen Temperaturschwankungen gibt, reifen ganzjährig Spermatozoen heran. *Rana temporaria* ist ein klassisches Beispiel mit diskontinuierlicher Spermatozoenproduktion. Im Frühjahr, bevor die Laichsaison beginnt, ist die Spermatogeneserate am höchsten, d. h. im Sommer befinden sich zahlreiche Keimzysten in verschiedenen Stadien in den Tubuli seminiferi. Im Hochsommer, bei hohen Umgebungstemperaturen, kommt es zur Ausschüt-

tung von Gonadotropin, was eine Refraktärphase der primären Spermatogonien zur Folge hat. Im Herbst reifen die bereits gebildeten Spermatozyten zu Spermatozoen und werden in der nächsten Laichperiode im Frühjahr abgegeben. Zwischen Oktober und Januar findet in den Tubuli seminiferi keinerlei spermatogenetische Aktivität statt (Lofts, 1974).

2.5.2.5. Spermiation

Unter Spermiation versteht man die Abgabe der Spermatozoen aus den Tubuli seminiferi in die Ductuli efferentes. Houssay und Lascano-Gonzales (1929) machten bei *Bufo arenarum* die Beobachtung, dass eine Hypophysenimplantation zu einer raschen Abgabe der Spermatozoen aus dem Hoden führt. Eine gonadotrope Stimulation konnte später auch bei Schwanzlurchen (Urodela) und anderen Froschlurchen (Anura) festgestellt werden.

Die Zielzellen der Gonadotropine sind die Sertoli-Zellen. In-vitro-Versuche an isoliertem Hodengewebe, unter anderem von *Rana temporaria* (van Dongen und de Kort, 1959), ergaben, dass durch eine Injektion von Gonadotropinen eine Spermiation ausgelöst werden konnte. Bei der Anwendung von gereinigten Gonadotropinen mammilären Ursprungs bei *Rana temporaria* konnte mit dem luteinisierenden Hormon (LH) eine Spermiation induziert werden, während das follikelstimulierende Hormon (FSH) keine Reaktion hervorrief (Lofts, 1961).

Die Spermiation geht einher mit einer Tubulusdilataion und einer deutlichen Größenzunahme und Vakuolisierung des Zytoplasmas der Sertoli-Zellen. So wird die Spermiation durch einen starken Anstieg des Flüssigkeitsgehalts im Tubulus und einen anschließenden Abfluss in Richtung Ductuli efferentes ausgelöst (van Oordt et al., 1954). Diese Beobachtung wurde bestätigt durch die Tatsache, dass eine Verabreichung von Gonadotropinen an *Rana temporaria* u. a. zu einer deutlichen Zunahme des Wassergehalts des Hodens führte (van Dongen et al., 1959); derselbe Effekt konnte in vitro ausgelöst werden (van Dangen und de Kort, 1959). Die Zunahme der Osmolarität der Tubuli seminiferi könnte verursacht werden durch eine Depolymerisation von Mukopolysacchariden in ihre Grundbestandteile (Mancinin und Burgos, 1948; van Dongen, 1958). In den Wintermonaten enthalten die Sertoli-Zellen von *Rana temporaria* sehr viel Glykogen; weiterhin lassen sich um die Spermienbündel im Tubuluslumen saure Mukopolysaccharide nachweisen. Werden den Tieren in diesem Stadium Gonadotropine verabreicht, können innerhalb von drei Stunden keine Mukopolysaccharide mehr nachgewiesen werden. Außerdem kommt es zu einer Abgabe des Glykogens aus den Sertoli-Zellen ins Tubuluslumen. In den Ductuli efferentes können im Anschluss neben den Spermienbündeln große Mengen an Glykogen gefunden werden.

Burgos und Vitale-Calpe (1967) und Burgos et al. (1968) unterscheiden bei der Spermiation drei elektronenmikroskopisch sichtbare Stadien. Die ersten Veränderungen nach einer Verabreichung von gereinigtem LH oder menschlichem Choriongonadotropin (HCG) werden nach einer Stunde sichtbar. Das endoplasmatische Retikulum der Sertoli-Zellen vermehrt sich und schwillt an, so dass es einen Großteil des Zytoplasmas einnimmt. Die Sertoli-Zellen werden länger und bekommen eine säulenartige Form. Die Ausdehnung des endoplasmatischen Retikulums wird gefolgt von einer Schwellung des apikalen Zytoplasmas, so dass die Ausbuchtungen, in die die Spermienköpfe eingebettet waren, verschwinden. Zuletzt rupturiert die Sertolizelle am apikalen Pol und die Spermatozoen werden zusammen mit der in den Sertoli-Zellen vorhandenen Flüssigkeit und Zelltrümmern in das Tubuluslumen gespült.

2.5.3. Geschlechterverhältnis

In Tab. 1 sind Literaturangaben zum Geschlechterverhältnis bei *Rana temporaria* zusammengefasst. Dabei ist zu beachten, dass die Werte methodisch bedingt oft nicht die genauen Verhältnisse wiedergeben können. Die mit Fangzäunen ermittelten Zahlen geben zum Teil nur die Zahl der Zuwanderer wieder, wodurch der Weibchenanteil etwas überschätzt werden kann, da meist mehr Männchen als Weibchen im Laichgewässer überwintern. Aufgrund der vorliegenden Daten liegt der Weibchen-Anteil meist zwischen 30% und 50%. Weiterhin werden starke jährliche Schwankungen festgestellt. Ryser (1986) sieht für das Phänomen des ungleichen Geschlechterverhältnis folgende denkbare Ursachen: 1. Die Weibchen werden später geschlechtsreif. 2. Nicht alle Weibchen nehmen immer am Fortpflanzungsgeschehen teil. 3. Die Weibchen weisen eine geringere Überlebensrate auf. 4. Das Geschlechterverhältnis ist bereits bei den Larven oder Juvenilen zugunsten der Männchen verschoben. Gibbons und McCarthy (1984) sowie Ryser (1985) fanden bei ihren populationsbiologischen Untersuchungen heraus, dass Weibchen etwas später geschlechtsreif werden als Männchen. Ob sich diese Tatsache auf das Geschlechterverhältnis auswirkt, ist abhängig vom Anteil der zweijährigen Frösche an der Population. Vergleicht man bei der Studie von Ryser (1985) die Jahre 1983 und 1984 im Hinblick auf die Altersverteilung, wird der Einfluss deutlich. Fehlt dieser Jahrgang fast vollständig, wie 1983, so entfällt der Einfluss auf das Geschlechterverhältnis nahezu ganz und der Weibchen-Anteil liegt in der Größenordnung von 50%; ist er hingegen relativ stark vertreten, wie 1984, führt dies zu einer Verminderung des Weibchenanteils. Dass Weibchen öfter der Fortpflanzung fernbleiben als Männchen, konnte Ryser (1985) bei seinen Studien nicht feststellen, während dies von Grossenbader (1980) durchaus für möglich gehalten wird. Ebenso konnten keine Anhaltspunkte für unterschiedliche Überlebensraten bei den Adulten gefunden werden. Grossenbader (1980) hält jedoch eine höhere Mortalität der Weibchen bei der Laichablage für möglich, die zu einer Verschie-

bung des ursprünglichen 1:1 Verhältnisses führt. Ryser (1985) analysierte auch das Geschlechtsverhältnis in den einzelnen Altersklassen und fand mit einer Ausnahme ein signifikantes Überwiegen der Männchen. Da dies schon bei den Dreijährigen zu beobachten ist, ist die Ursache in unterschiedlichen Überlebensraten bis zur Geschlechtsreife oder in einem bei der Geschlechterdifferenzierung unausgewogenen Verhältnis zu suchen. Über beide möglichen Ursachen kann nur spekuliert werden. Daten zur Überlebensrate subadulter Grasfrösche liegen in der Literatur nicht vor. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass das Geschlecht der Amphibien zwar grundsätzlich genetisch festgelegt ist, ungewöhnliche Temperaturen und Hormone bzw. Stoffe mit hormoneller Wirkung jedoch zur Ausbildung eines vom Genotyp abweichenden Geschlechts führen können (Pieau 1975, Bull 1980). Weiteres siehe Kap. 2.7. Allerdings sprechen Untersuchungen von Piquet (1930), die bei „normalen“ Wassertemperaturen (18-20°C) ein Verhältnis von 1:1 bei *Rana temporaria* während der Metamorphose ergaben, gegen die Vermutung, dass das Geschlechterverhältnis bereits bei den Larven oder Juvenilen unter physiologischen Bedingungen zugunsten der Männchen verschoben ist. Ryser (1985) stellte schließlich fest, dass das unterschiedliche Muster der Geschlechtsreife im Zusammenwirken mit verschiedenen Jahrgangstärken, für den normalerweise geringeren Weibchen-Anteil und dessen große jährliche Schwankungen verantwortlich gemacht werden kann.

Tab. 1 Literaturangaben zum Geschlechterverhältnis von *Rana temporaria*

Autor	Ort	Jahr	n	Weibchen (%)	Männchen (%)
Oldham (1963)	England		130	ca.30	ca.70
Gibbons und McCarthy (1984)	Irland	1978	418	25	75
		1979	909	48	52
		1980	233	52	48
Geisselmann et al. (1971)	BRD		446	50	50
Filoda (1983)*	BRD	1980	137	58	42
		1981	231	56	44
Obert (1977)	BRD		<100	ca. 30	ca. 70
Blab (1982)	BRD	1976	160	49	51
		1977	231	56	44
		1978	74	32	68
		1979	80	49	51
Hellbernd (1985)*	BRD	1982	148	50	50
		1983	84	46	54
Pascual und Montori (1981)	Spanien		187	28	72
Conbes (1968)	Pyrenäen		?	50	50
Heusser (1970)	Schweiz		130	ca. 30	ca. 70
Grossenbacher (1980)	Schweiz		ca.700	36	64
Hintermann (1984) &	Schweiz	1980	6126	42	58
		1981	ca.4000	50	50
		1982	4308	37	63
		1983	1100	47	53
Ryser (1986)*	Schweiz	1984	821	39	61

* Bestandszahlen mit Hilfe von Fangzäunen ermittelt
& Werte von zwei benachbarten Gewässern zusammengelegt

Populationsdynamische Untersuchungen von *Xenopus laevis* konnten in den gesichteten Veröffentlichungen nicht gefunden werden. Im Rahmen von Untersuchungen zur östrogenen Potenz von Umweltchemikalien (Kloas und Lutz, 1999) ergab sich bei der in Leitungswasser gehaltenen Kontrollgruppe ein Geschlechterverhältnis von 42,6% männlichen und 57,4% weiblichen Tieren bei einer Gesamtzahl von 69 Tieren. Eine Kontrollgruppe, die unter denselben Bedingungen gehalten wurde, wies bei einer Gesamtzahl von 82 Tieren 60% Männchen auf (Kloas et al., 1999). Somit kann aus den bisherigen Untersuchungen keine Tendenz zur Verschiebung des Geschlechterverhältnisses in die eine oder andere Richtung festgestellt werden. Autoren, die Untersuchungen zum Einfluss von Sexualsteroiden auf die Geschlechtsentwicklung gemacht haben (Witschi und Allison, 1950; Gallien, 1953; Gallien, 1956; Gallien, 1974), gehen von einem „normalen“ Geschlechterverhältnis von 1:1 aus.

2.5.4. Intersexualität und Hermaphroditismus

2.5.4.1. Natürliche Intersexualität

Natürliche Intersexualität wird vor allem bei juvenilen Tieren beobachtet, kommt selten aber auch bei Adulten vor. Juvenile Intersexualität wird nur bei geschlechtlich undifferenzierten Rassen, wie zum Beispiel Mittellandpopulationen von *Rana temporaria*, beobachtet. *Rana temporaria* tritt in großen Teilen Nordeuropas und Sibirien auf und kommt sowohl im Flachland als auch im Gebirge bis zu 2000 Metern vor. Man unterscheidet geschlechtlich differenzierte und undifferenzierte Rassen. Dieses Phänomen wurde erstmalig von Pflüger (1882) beobachtet und später von Witschi (1921, 1930, 1934) an derselben Rasse weiter erforscht. Geschlechtlich differenzierte Rassen von *Rana temporaria* kommen vor allem in höheren Lagen vor. Von Witschi (1930) wurden sie in den Alpen bei Davos, von Gallien (1941) in den Pyrenäen bei Pratlong beobachtet. Bei diesen Gebirgsrassen entwickeln sich die Gonaden direkt in die männliche oder weibliche Richtung, so dass das gonadale Geschlecht direkt nach der Metamorphose endgültig feststeht und ein Geschlechterverhältnis von 50% Weibchen und 50% Männchen besteht. Somit kommt es bei Tieren dieser Populationen nicht zur Ausbildung von Hermaphroditen während der Entwicklung. Im Gegensatz zu den geschlechtlich differenzierten Rassen von *Rana temporaria* der Gebirgsregionen, gibt es zahlreiche Populationen, vor allem in flacher gelegenen Bereichen, die als geschlechtlich undifferenziert bezeichnet werden. Bei diesen Tieren finden sich während der Metamorphose, auch bei genotypisch männlichen Individuen, ausschließlich Ovarien. Bei allen Kaulquappen findet die Entwicklung zunächst in die weibliche „Richtung“ statt, das heißt genotypische Männchen sind zu diesem Zeitpunkt nicht von genotypischen Weibchen zu unterscheiden. Nach der Metamorphose, zwischen dem sechsten bis neunten Monat, beginnen sich in den genotypischen Männchen die bis dahin gebildeten Ovarien in Hoden „umzuwandeln“. Im Verlauf dieses Umwandlungsprozesses kommt es zur Bildung von intersexuellen Gonaden, die sowohl weibliche als auch männliche Keimzellen enthalten.

Zusätzlich zu den differenzierten und undifferenzierten Rassen findet man bei *Rana temporaria* semidifferenzierte Populationen (Gallien, 1974). Bei diesen Rassen bilden sich ebenfalls zunächst bei allen Individuen weibliche Gonaden, aber im Gegensatz zu den undifferenzierten Rassen treten bereits während der Metamorphose Hermaphroditen auf. Die semidifferenzierten Rassen repräsentieren einen intermediären Typ. Die Entwicklung von differenzierten und undifferenzierten Rassen ist nicht zwangsläufig an das Vorkommen der Population in Gebirgsregionen bzw. niedriger gelegenen Regionen gebunden, für *Rana temporaria*-Populationen ist es jedoch typisch (Gallien, 1974). Das Auftreten von geschlechtlich undifferenzierten Rassen konnte auch bei anderen Anura, wie zum Beispiel bei *Rana escu-*

lenta festgestellt werden (Ponse, 1949; Foote, 1964). Bei *Xenopus laevis* kann es in der juvenilen Phase zum temporären Auftreten von Oozyten in männlichen Gonaden kommen. Wie häufig und warum dieses Phänomen auftritt ist jedoch nicht geklärt (Gallien, 1974).

2.6. Hypophysen-Gonaden-Achse

Wie bei allen anderen Vertebraten, wird auch bei Amphibien die saisonale Entwicklung und funktionelle Aktivität der männlichen und weiblichen Gonaden von der Adenohypophyse reguliert. Die Hypophyse wiederum steht unter der Kontrolle des Hypothalamus. Die von den neurosekretorischen Neuronen des Hypothalamus produzierten Releasing-Hormone gelangen über das Pfortadersystem zum Gefäßnetz der Adenohypophyse und bewirken eine Freisetzung der Hypophysenvorderlappenhormone.

2.6.1. Regulation der männlichen Gonade

Ein Zusammenhang zwischen dem Aktivitätszustand des Hodengewebes und der Gonadotropinausschüttung der Hypophyse wurde mehrfach untersucht und nachgewiesen. Nach Sklower (1925) und van Oordt et al. (1968) besteht eine Abhängigkeit zwischen Gonadotropinausschüttung und saisonalen Veränderungen des Keimepithels bei *Rana temporaria*.

In vielen Versuchen wurde der Effekt einer Hypophysektomie bzw. einer Entfernung ausschließlich der Pars distalis auf die Gonaden untersucht (u. a. Gallien 1939, 1940; van Oordt 1956; Lofts 1961). Die durch eine Hypophysektomie induzierte Hodenatrophie kann durch eine Injektion von Hypophysenextrakt verhindert werden (van Oordt et al. 1951; van Oordt 1956). Der Einfluss einer Hypophysektomie auf die Spermatogenese ist jahreszeitlich unterschiedlich. Bei *Rana temporaria* wurde während der Ruhephase ausschließlich ein vollständiger Verlust der Teilungsfähigkeit der primären Spermatogonien beobachtet (van Oordt, 1956). Während der spermatogenetisch aktiven Zeit hingegen kam es zu deutlichen degenerativen Veränderungen, wobei die sekundären Spermatogonien besonders stark betroffen waren (van Oordt, 1956, 1960). Die Anzahl der Spermatozoen-Bündel veränderte sich nicht. Eine Beeinflussung der Spermiohistogenese, die Differenzierung der Spermatiden zu reifen Spermatozoen, durch Gonadotropine ist somit unwahrscheinlich (Lofts, 1974). Auch die Sensitivität des Keimepithels gegenüber Gonadotropinen ist jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen. In Untersuchungen, in welchen hypophysektomierte *Rana temporaria* mit Hypophysenextrakt von Amphibien behandelt wurden, führten gleiche Mengen Extrakt während der Sommermonate zu einer deutlich höheren spermatogenetischen Aktivität als während der Wintermonate (van Oordt und van Oordt 1955). Mialhe-Voloss (1956) konnte bei *Rana*

esculenta ebenfalls deutliche jahreszeitliche Unterschiede in der Ansprechbarkeit des Keim-epithels feststellen.

Mit histochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Gonadotropine auch eine regulierende Funktion auf die ultrastrukturellen Eigenschaften der Sertoli-Zellen ausüben. Nach Hypophysektomie zeigten die Sertoli-Zellen in der spermatogenetisch inaktiven Zeit eine deutliche Akkumulation an cholesterolhaltigen Lipiden (Lofts, 1961). Normalerweise sind die Sertoli-Zellen in den Wintermonaten frei von Lipideinschlüssen und enthalten stattdessen große Mengen Glykogen.

Bei Säugetieren wird die Aktivität des Hodens durch zwei verschiedene Gonadotropine, das follikelstimulierende Hormon (FSH), welches die Spermatogenese positiv beeinflusst und das luteinisierende Hormon (LH), welches das Wachstum der Leydig'schen Zwischenzellen und die Androgensynthese anregt, reguliert. Ob bei Amphibien die Spermatogenese und die Aktivität der interstitiellen Zellen ebenfalls von zwei unterschiedlichen Gonadotropinen reguliert werden, ist noch nicht geklärt. Zur Zeit geht man davon aus, dass bei Amphibien die Funktion des Hodens von nur einem Gonadotropin reguliert wird, da bisher auch nur ein Gonadotropin aus der Hypophyse von Amphibien isoliert werden konnte (Lofts, 1974). Versuche die mit Säugetier-Gonadotropinen gemacht wurden, führten zu folgenden Ergebnissen: Die Injektion von reinem FSH führte bei hypophysektomierten Raniden (*Rana temporaria*) zur Stimulation der Spermatogenese, hatte jedoch keine Wirkung auf die Spermiation oder die interstitiellen Zellen. Die Gabe von LH führte zur Anregung der Spermiation und der Androgenproduktion (Lofts 1961). Die bei *Rana temporaria* festgestellten selektiven Reaktionen auf die beiden mammilären Gonadotropine konnten jedoch bei anderen Spezies nicht beobachtet werden. Bei *Xenopus laevis* führten sowohl LH als auch FSH zur Spermiation (Barr 1968). Weiterhin konnte bei dieser Spezies in vivo und in vitro sowohl mit FSH als auch mit LH ein deutlicher Anstieg der Steroiddehydrogenaseaktivität induziert werden (Wiebe, 1970). Dass die Spermatogenese nicht synchron mit der Aktivität der interstitiellen Zellen verläuft, obwohl beide von einem Gonadotropin reguliert werden, erklären van Oordt und de Kort (1969) mit einer temperaturabhängigen Sensitivität der beiden Gewebe. Kalte Umgebungstemperaturen führen zu einer Reaktion der interstitiellen Zellen, wohingegen der Temperaturanstieg im Frühling zu einer vermehrten Sensitivität des Keimepithels führt.

Die vom Hoden gebildeten Sexualsteroiden haben eine negative Feedback-Wirkung auf die Gonadotropinausschüttung der Hypophyse. Bei einem Versuch wurden Testosteronpellets in den dorsalen Lymphsack von *Rana temporaria* implantiert. Van Oordt (1961) beobachtete bei diesen Tieren einen antigonadalen Effekt und führte diesen auf eine Hemmung der Gonadotropinausschüttung durch Testosteron zurück. Dieser antigonadale Effekt wurde in

Versuchen mit anderen Amphibienarten ebenfalls beobachtet. Der zu beobachtende atrophische Effekt ähnelte dem nach Hypophysektomie. Die Bildung der sekundären Spermato gonien war vermindert, spätere Stadien waren nicht beeinflusst.

2.6.2. Regulation der weiblichen Gonade

Auch die Ovarien werden durch Gonadotropine, die von Zellen der Pars distalis der Hypophyse gebildet und abgegeben werden, reguliert. Bei weiblichen Fröschen durchgeführte Hypophysektomien führten zu atrophischen Veränderungen der Ovarien und zu einer verringerten Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale (Gallien 1939, 1940). Bei primären Follikeln in der primären/previtellogenen Wachstumsphase konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Ab der sekundären Wachstumsphase konnte eine Hemmung der Vitellogenese und der Follikelentwicklung beobachtet werden und reife Oozyten degenerierten. Das durch Hypophysektomie bedingte Auftreten von atretischen Follikeln in der sekundären Wachstumsphase wird begrenzt durch eine spezie-spezifische kritische Größe der Follikel. Bei Follikeln mit kleinerem Durchmesser hat die fehlende Ausschüttung von Gonadotropin nur einen geringen Effekt. Für *Rana temporaria* liegt die kritische Größe zwischen 350 und 400 μm (Gallien 1940a). Eine Verabreichung von Amphibien-Hypophysenextrakt oder von Hormonen mammilären Ursprungs führt zur Stimulation von regressiven Ovarien, sowohl bei intakten als auch bei hypophysektomierten Tieren, wobei ersteres zu einer stärkeren Reaktion führt (Barr 1968).

Die Tatsache, dass FSH und LH unterschiedliche Effekte auf Vitellogenese und Ovulation hervorrufen, führte zu der Vermutung, dass die Aktivität der Amphibienovarien ebenfalls von zwei unterschiedlichen Gonadotropinen kontrolliert wird. FSH induziert ein ovarielles Wachstum, hat aber nur eine geringe ovulatorische Wirkung, wo hingegen LH eine starke ovulatorische Potenz aufweist (Lofts 1974). Aber es gibt auch bei Weibchen Hinweise dafür, dass nur ein einziges Gonadotropin für die Regulation der Follikelentwicklung und indirekt auch für die Ovulation verantwortlich ist. Untersuchungen von Otsuka (1957) ergaben, dass die Hypophyse von Amphibien sowohl FSH- als auch LH-Eigenschaften aufweist. Er konnte mit unbehandelten Hypophysenextrakten von Raniden in einem Bioassay bei Mäusen FSH- und LH-typische Reaktionen auslösen.

Östrogen hat eine negative Feedback-Wirkung auf die Gonadotropinsekretion. Dies wird zum einen gestützt durch die Tatsache, dass eine einseitige Ovariectomie in einer kompensatorischen Hypertrophie des verbleibenden Ovars resultiert, bedingt durch die reduzierte Östrogenproduktion (Lofts 1974). Weiterhin zeigten Benson et al. (1969), dass eine einseiti-

ge Ovariectomie zu einem Anstieg von Gonadotropin im Serum führt. Dieser Anstieg konnte durch Injektion von Estradiol verhindert werden. Rastogi und Chieffi (1970) injizierten kurz zuvor ovariectomierten *Rana esculenta* Estradiolbenzoate und konnten damit die normalerweise auftretenden Veränderungen in den Gonadotropin produzierenden Zellen der Pars distalis der Hypophyse verhindern.

2.7. Äußere Einflüsse auf die Geschlechtsentwicklung

2.7.1. Temperatur

In zahlreiche Studien wurde der Einfluss der Temperatur auf das Geschlecht von Amphibien untersucht. Bei Fröschen wurden diese Untersuchungen bei einer Bufo Spezies (Piquet 1930) und vier verschiedenen Rana-Spezies (Witschi 1914, 1929; Piquet 1930; Yoshikura 1959; Hsü et al. 1971) durchgeführt. Alle diese Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die Wassertemperatur das Geschlecht der Larven beeinflussen kann. Bei besonders hohen Temperaturen (27 bis 36°C), die in der Natur normalerweise nicht vorkommen, entwickelten sich 100% Männchen; besonders niedrige Temperaturen führten zur Ausbildung von 100% Weibchen. Witschi (1929) hielt Kaulquappen von *Rana sylvatica* zunächst vier Wochen bei einer Temperatur von 20°C. Es entwickelte sich ein Geschlechterverhältnis von 1:1. Ab dem Ende der fünften Woche wurde ein Teil der Kaulquappen bei einer Temperatur von 32°C gehalten. Die männlichen Tiere setzten ihre normale Entwicklung fort. Bei den weiblichen Tieren wurden folgende Beobachtungen gemacht: Die Rinde stellte die Produktion von Oozyten ein und die bereits differenzierten Oozyten degenerierten. Das Mark begann zu proliferieren und bildete Tubuli seminiferi aus. Die primordialen Zellen in den Keimsträngen vermehrten sich und differenzierten sich zu Spermatogonien. Schließlich hat sich die zunächst embryologisch als Ovar angelegte Gonade vollständig in einen Hoden umgewandelt. Piquet (1930) macht bei *Rana temporaria* ähnliche Beobachtungen. Bei einer Temperatur von 18 bis 20°C erhielt er während der Metamorphose ein Geschlechterverhältnis von 1:1, bei einer Wassertemperatur von 27°C war die Entwicklung beschleunigt und es entwickelten sich 100% männliche Tiere. Die Kaulquappen, die bei 10°C gehalten wurden, entwickelten sich ausschließlich zu Weibchen, außerdem war das Wachstum verlangsamt und die Metamorphose verzögert. Diese Versuche zeigen, dass hohe Temperaturen die Entwicklung des Marks aktivieren, niedrige Temperaturen stimulieren die Rinde. Der Mechanismus für dieses Phänomen ist nicht bekannt.

Betrachtet man die in den Versuchen gewählten Temperaturen, fällt auf, dass diese unter natürlichen Bedingungen so gut wie nicht vorkommen, so dass abschließend gesagt werden

kann, dass der Einfluss der Temperatur unter natürlichen Bedingungen auf die Ausbildung des Geschlechts nur einen sehr geringen Effekt ausübt.

2.7.2. Hormone und hormonell wirksame Stoffe

Die Gonaden der Amphibien synthetisieren Sexualsteroid, die sich in vielerlei Hinsicht regulierend auf den Geschlechtsapparat auswirken. Es stellt sich die Frage, inwieweit exogene Sexualsteroid einen Einfluss auf die Geschlechtsdifferenzierung der Gonaden und die Ausbildung der sekundären Geschlechtsorgane haben. Bei den zahlreich durchgeführten Versuchen zum Einfluss der Sexualsteroid auf die Geschlechtsentwicklung, können folgende grundsätzliche Beobachtungen gemacht werden. Einzelne Steroid können einen unterschiedlichen Effekt bei verschiedenen Arten hervorrufen und ein und dasselbe Steroid kann, abhängig von der Dosis, bei einer Spezies unterschiedliche Effekte erzielen.

Die Wirkung von Östrogenen ist bei Raniden stark dosisabhängig. Hohe Dosen Estradiol (3,7-18,5 μM , *Rana pipiens*: Chang und Witschi, 1955c) führten zu einem paradoxen Effekt, es entwickeln sich zu 100% Männchen. Ähnliche Beobachtungen sind bei *Rana temporaria* von Gallien (1940b, 1941) gemacht worden; die angewandte Konzentration ist nicht bekannt. Bei schwachen Dosierungen (0,07-0,37 μM) von Estradiol konnte die Entwicklung von 100% Weibchen beobachtet werden (Chang und Witschi, 1955c). Gallien (1974) spricht bei niedrigen Konzentrationen von einer temporären Feminisierung. Mittlere Dosen (1,85 μM) führten sowohl zur Ausbildung von normalen Weibchen und Männchen, als auch zur Bildung von Tieren mit intersexuellem Geschlecht (Chang und Witschi, 1955c).

Auch bei *Xenopus laevis* sind die Auswirkungen von Östrogenen dosisabhängig, wobei bei dieser Spezies keine paradoxen Effekte auftreten. Bei hohen Dosierungen (s. Tab.) entwickelten sich ausschließlich phänotypisch weibliche Tiere (Witschi und Allison, 1950; Gallien, 1953; Gallien, 1956). Bei Versuchen mit Estradiolbenzoat in unbekannter Dosierung entwickelten sich neben normal entwickelten Weibchen Hermaphroditen (Gallien, 1954). Bei Versuchen von Kloas et al. (1999) kommt es bereits bei einer Dosierung von 0,1 μM zu einer fast vollständigen Feminisierung. Bei einer Konzentration von 0,01 μM konnte eine signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnisses in Richtung der Weibchen festgestellt werden. Das Auftreten von Hermaphroditen wird von diesen Autoren nicht beschrieben.

Wurden bei Raniden einer geschlechtlich undifferenzierten Rasse (s. Kap. 2.11.1) Testosterone als ölige Lösung ab dem Larvenstadium injiziert, so kam es zur Anbildung von Hoden bei allen Tieren, auch den genotypisch Weiblichen (Gallien, 1937).

Tab. 2 Einfluss von Sexualsteroiden und Alkylphenolen auf die Geschlechtsentwicklung (Literaturübersicht)

Substanz	Konzentration [μ M]	Spezies	Effekt	Referenz
Androgene				
Androsteron	0,3-3,0	Xenopus laevis	MW	Chang und Witschi (1955b)
Testosteron	Inj.	Rana temporaria	M	Gallien (1937, 1943)
TP	0,3-29,2	Xenopus laevis	MW	Chang und Witschi (1955b)
TP	1,7	Xenopus laevis	MI	Gallien (1956)
TP	1,7	Xenopus laevis	MIW	Gallien (1962)
Östrogene				
Estradiol	?	Rana temporaria	M	Gallien (1940, 1941)
Estradiol	0,07-0,37	Rana spp.	W	Chang und Witschi (1955c)
Estradiol	1,85	Rana spp.	MIW	Chang und Witschi (1955c)
Estradiol	3,7-18,5	Rana spp.	M	Chang und Witschi (1955c)
Estradiol	0,04	Xenopus laevis	MW	Chang und Witschi (1955a,b)
Estradiol	0,18-0,36	Xenopus laevis	W	Chang und Witschi (1955a,b)
Estradiol	0,185-2,2	Xenopus laevis	W	Gallien (1953)
Estradiol	0,185-2,2	Xenopus laevis	W	Gallien (1957)
Estradiol	0,1	Xenopus laevis	W(M)	Kloas et al. (1999)
Estradiol	0,01	Xenopus laevis	W>M	Kloas et al. (1999)
EB	?	Xenopus laevis	IW	Gallien (1954)
EB	0,13	Xenopus laevis	W	Gallien (1956)
EB	0,001-1,6	Xenopus laevis	W	Gallien (1955, 1962)
EB	0,11-0,66	Rana sylvatica	MW	Witschi (1948)
EB	1,6	Rana sylvatica	W	Witschi (1948)
EE	0,03	Rana sylvatica	MIW	Witschi und Allison (1950)
EE	0,3-4,2	Rana sylvatica	F	Witschi und Allison (1950)
Alkylphenole				
Nonylphenol	0,1	Xenopus laevis	W>M	Kloas et al.(1999)
Oktylphenol	0,1	Xenopus laevis	W>M	Kloas et al.(1999)
Oktylphenol	0,01	Xenopus laevis	W>M	Kloas et al.(1999)

TP: Testosteronpropionat; EB: Estradiolbenzoat; EE: Ethinylestradiol

Die Steroide wurden über das Wasser verabreicht.

Inj: die Steroide wurden den Larven injiziert (genaue Konzentration ebenfalls nicht bekannt).

W: Weibchen, M: Männchen, I: Intersex, MW: keine signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnis,

W: 100% Weibchen, M: 100% Männchen, W(M): annähernd 100% Weibchen, W>M: signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnis zugunsten der Weibchen, MIW: Entwicklung von normalen Männchen und normalen Weibchen, zusätzlich treten Hermaphroditen auf. IW: partielle Geschlechtsumwandlung bei den Männchen (Hermaphroditen), die Weibchen entwickeln sich normal. MI: die Männchen entwickeln sich normal, partielle Geschlechtsumwandlung bei den Weibchen (Hermaphroditen)

Die Gabe von Testosteron während des gesamten Larvenstadiums führte bei *Xenopus laevis* zu einer nicht regulären Entwicklung der Gonaden. Diese waren kleiner als normal und hatten eine unregelmäßige Gestalt. Bei den weiblichen Tieren konnten Bereiche ohne Keimzellen zwischen normal ausgebildetem Ovargewebe beobachtet werden. Bei einigen Tieren fanden sich Inseln mit Hodengewebe in den Ovarien, es kam also zur Ausbildung von Hermaphroditen. Auch bei den genetisch männlichen Tieren konnten Hermaphroditen beobachtet werden (Lofts, 1974).

Die Wirkung von Xenoöstrogenen auf die Gonadenentwicklung von Amphibien wurde bisher nur von Kloas et al. (1999) bei *Xenopus laevis* untersucht. Bei Untersuchungen mit Alkylphenolen konnte gezeigt werden, dass sowohl Nonylphenol als auch Octylphenol bereits bei Konzentrationen von 0,1 μMol zu einer signifikanten Verschiebung des Geschlechts zugunsten der weiblichen Tiere führen.

2.8. Vitellogenese

Unter Vitellogenese versteht man die Synthese und Akkumulation von Dotter in der Eizelle. Der Dotter dient der Ernährung des Embryos in den frühen Entwicklungsstadien und ist ein Sammelbegriff für verschiedene chemische Gruppen. Im Gegensatz zu Vögeln ist bei Amphibien der größte Teil der Nährstoffe in Form von Protein gespeichert. Proteine machen 45% des Trockengewichts einer reifen Oozyte aus, Lipide 25% und Glykogen 8% (Barth und Barth, 1954). 4/5 der Proteine und ein hoher Prozentsatz der Lipide liegen in Form von Dotterplättchen vor, der charakteristischen Struktur des Amphibieneis.

Vitellogenin ist ein calcium- und phosphorreiches Glykolipophosphoprotein und stellt die Vorstufe des Dotterproteins dar (Follet und Redshaw, 1974). In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Vitellogenin in der Leber stattfindet. Bei hepatektomierten *Xenopus laevis* konnte durch eine Östrogenbehandlung kein Anstieg von Vitellogenin im Plasma ausgelöst werden, wohingegen bei ovariektomierten Tieren der Plasmavitellogeninspiegel stark anstieg (Munday et al., 1968). Tieren, die mit HCG behandelt wurden, wurde 10 Tage später ^{14}C -Leuzin injiziert. Schon nach wenigen Stunden konnte in der Leber ^{14}C -markierte Protein beobachtet werden. Das markierte Protein erschien daraufhin in der Serumproteinfraktion und anschließend im Ovar.

Bei der Regulation der Vitellogenese spielen Östrogene eine primäre Rolle. Die Sekretion der Steroide steht unter der Kontrolle der Gonadotropine. Somit unterliegt die Vitellogenese der Kontrolle der Gonaden-Hypophysen-Achse. Zusätzlich haben die Gonadotropine einen direkten Einfluss auf die Akkumulation von Dotter in der Eizelle (Follett und Redshaw, 1974).

In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Auslösung der Vitellogeninsynthese allein durch Östrogene erfolgt (Redshaw et al., 1969). Testosteron, Progesteron und Kortisol bewirken keinen Anstieg von Vitellogenin im Plasma, wohingegen die drei natürlich vorkommenden Östrogene 17 β -Estradiol, Estron und Estriol – einen sich logarithmisch zur Dosis verhaltenden Konzentrationsanstieg hervorrufen. Mithilfe von Antisera gegen Vitellogenin konnte gezeigt werden, dass im Serum von männlichen *Xenopus laevis* kein Vitellogenin vorkommt. Werden diese jedoch mit Östrogenen behandelt, kommt es auch bei den männlichen Tieren zur Synthese von Vitellogenin, welches im Serum nachgewiesen werden kann (Wallace, 1967; Wallace und Jade, 1968a, 1969; Follett und Redshaw, 1967, 1968). Die physiologische Halbwertszeit für Vitellogenin beträgt bei weiblichen *Xenopus laevis* 1,8 Tage, bei östrogenbehandelten Männchen 40 Tage (Wallace und Jared, 1968a).

Kloas et al. (1999) führte in-vitro-Versuche mit primären Hepatozytenkulturen von männlichen *Xenopus laevis* durch. Die Bestimmung der Vitellogenin-mRNA erfolgte mittels semi-quantitativer RT-PCR. Mit diesem Modell konnte eine dosisabhängige Stimulation der Vitellogenin mRNA mittels 17 β -Estradiol (E2) nachgewiesen werden. Ein messbarer Anstieg konnte ab einer Konzentration von 10^{-6} M E2 ermittelt werden, eine Sättigung wurde ab einer Konzentration von 10^{-9} M erreicht. Zusätzlich wurden diese Versuche mit den Xenoöstrogenen Nonylphenol (NP) und Bisphenol A durchgeführt und führten zu folgenden Ergebnissen: NP führt ab einer Konzentration von 10^{-8} M zu einem messbaren Effekt, Bisphenol A ab einer Konzentration von 10^{-7} M. Beide Chemikalien waren jedoch nicht in der Lage eine Sättigung von Vitellogenin-mRNA zu erzielen.

3. Material und Methoden

3.1. Problemstellung und Projektbeschreibung

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines vom Umweltbundesamt geförderten Verbundprojekts mit dem Titel „Wirkung von endokrin wirksamen Stoffen auf Amphibien: Effekt-monitoring mit frühen Entwicklungsstadien und In-vitro-Systemen in belasteten Gewässern“ (Förderkennzeichen: 29965221/32) durchgeführt.

Das Projekt erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei in Berlin und der eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG) in Dübendorf, Schweiz.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung und Bewertung der Belastung mit östrogenwirksamen Stoffen in einem süddeutschen Gewässer oberhalb und unterhalb eines Kläranlagenablaufes und deren Auswirkung auf die Gonadenentwicklung von Amphibien (Frösche). In einem Expositionsversuch wurde die Wirkung unterschiedlicher Abwasserverdünnungen auf einheimische Grasfrösche (*Rana temporaria*) mit jenen auf den südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) verglichen. Die Entnahme des Grasfroschlaichs aus den Laichgewässern wurde von der Regierung von Oberbayern nach dem Naturschutzgesetz genehmigt. Die durchgeführten Versuche wurden nach dem Tierschutzgesetz bei der Regierung von Oberbayern angezeigt.

In Abteilung 5 des Bayerischen Landesamts für Wasserwirtschaft wurden zur Ermittlung endokriner und toxischer Wirkungen des Abwassers folgende Endpunkte untersucht: Zunächst erfolgte eine Erfassung und Beurteilung der Entwicklung während der Embryonal- und Larvalphase zu zwei Zeitpunkten. Den Schwerpunkt der Untersuchungen bildeten die histologische Beurteilung des Gonadengewebes von exponierten und Kontrollfröschen hinsichtlich der gonadalen Geschlechtsdifferenzierung sowie die Bestimmung des Geschlechterverhältnisses. Eine histopathologische Untersuchung der Frösche diente dem Ziel, toxische Effekte von Abwasserinhaltsstoffen sowie andere potentielle Einflussfaktoren, wie zum Beispiel Erregerbedingte Erkrankungen der Frösche zu erkennen und auszuschließen. Chemisch-analytische Untersuchungen (GC/MS, LC/MS) dienten zudem der quantitativen Bestimmung östrogenen Stoffe in Wasserproben. Mit der vom Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei durchgeführten semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Vitellogenin-mRNA soll ein eventuell vorhandener Einfluss auf die Expression von östrogenabhängigen Genprodukten überprüft werden.

Von der eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG) in Dübendorf, Schweiz wurden Grasfrösche aus einer Mittellandpopulation und zwei hochalpine Populationen unterschiedlichen Alters zu Verfügung gestellt. Diese

dienten dem Vergleich bei uns beheimateten Grasfröschen mit Individuen aus anderen Habitaten wie zum Beispiel hochalpinen Regionen, im Hinblick auf die Geschlechtsdifferenzierung. Weiterhin erfolgten am Institut für Anatomie II der Tierärztlichen Fakultät der LMU elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen an Gonadengewebe von *Rana temporaria*. Diese dienten zum einen der Erfassung auf lichtmikroskopischer Ebene nicht erkennbarer Veränderungen, zum anderen aber auch einer grundsätzlichen Erfassung ultrastruktureller und immunhistochemischer Eigenschaften des Gonadengewebes von *Rana temporaria*.

Tab. 3 gibt einen Überblick über die durchgeführten Untersuchungen.

Tab. 3 Gruppen und durchgeführte Untersuchungen

Gruppe	Tierart	Alter der Tiere	Anzahl der Tiere	durchgeführte Untersuchungen
Ia (Expositionsversuch)	<i>Rana temporaria</i>	ca. 4 Monate	740	Bestimmung von Entwicklungsstadien Lichtmikroskopie von Gonadengewebe Immunhistochemie von Gonadengewebe Organpathologie
Ib (Expositionsversuch)	<i>Xenopus laevis</i>	ca. 4 Monate	307	Bestimmung von Entwicklungsstadien Lichtmikroskopie von Gonadengewebe Organpathologie Messung der Vitellogenin-mRNA
II (Wielenbach, nicht exponiert)	<i>Rana temporaria</i>	ca. 18 Monate	62	Lichtmikroskopie von Gonadengewebe Immunhistochemie von Gonadengewebe Transmissionselektronenmikroskopie von Gonadengewebe
IIIa (Zusatzgruppe: Maloja, nicht exponiert)	<i>Rana temporaria</i>	ca. 4 Monate	35	Lichtmikroskopie von Gonadengewebe Transmissionselektronenmikroskopie von Gonadengewebe
IIIb (Zusatzgruppe: Zürich, nicht exponiert)	<i>Rana temporaria</i>	ca. 18 Monate	50	Lichtmikroskopie von Gonadengewebe Transmissionselektronenmikroskopie von Gonadengewebe
IIIc (Zusatzgruppe: Maloja, nicht exponiert)	<i>Rana temporaria</i>	ca. 16,5 Monate	33	Lichtmikroskopie von Gonadengewebe

3.2. Exposition und Haltung

3.2.1. Gruppe I (Expositionsversuch)

Dieser Versuch wurde mit zwei Froscharten durchgeführt. Als Vertreter einer einheimischen Art wurde der Grasfrosch (*Rana temporaria* Linnaeus, 1758) gewählt. Der in Deutschland weit verbreitete Grasfrosch gehört zu Unterart *Rana temporaria temporaria*. Parallel wurden zum Vergleich Versuche mit dem afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* Daudin gefahren. Diese Froschart stellt ein gut dokumentiertes Versuchstier dar, welches eine rein aquatische Lebensweise aufweist.

Der Laich von *Rana temporaria* wurde am 04.04.00 aus einem unbelasteten Gewässer der Versuchsanlage Wielenbach entnommen und von dort direkt in Aquarien der Expositionsanlage gebracht. Der ausgewählte Laich wies zu diesem Zeitpunkt das Entwicklungsstadium 12-14 auf (Gosner, 1960), das heißt die Embryonen befanden sich in der späten Gastrulationsphase. Die verwendeten Krallenfrösche entstammten dem Labor des Instituts Zoologie II der Universität Karlsruhe. Die Laichablage wurde bei diesen Tieren mit humanem Choriongonadotropin (HCG) induziert. Am 04.04.00 wurden die Krallenfrosch-Kaulquappen ebenfalls in Aquarien der Expositionsanlage umgesetzt. Die Kaulquappen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Entwicklungsstadium 33-36 (Nieuwkoop und Faber, 1975), welches durch eine Gesamtkörperlänge von 6-6,5 mm charakterisiert ist.

3.2.1.1. Haltung und Expositionsbedingungen während des Larvenstadiums

Die Kontrollgruppen beider Froscharten wurden in Würmwasser gehalten. Das Wasser wurde an einer Stelle oberhalb des Kläranlageneinlaufs abgezweigt. Die Exposition mit Kläranlagenwasser erfolgte in zwei verschiedenen Verdünnungen. Mit der Verdünnung 1:12 (Kläranlagenablauf : Würmwasser) wurde die Belastungssituation direkt unterhalb des Kläranlagenauslaufs in die Würm dargestellt. Die Verdünnungsstufe 1:2 sollte eine deutlich höhere Belastung simulieren. Das Wasser des Kläranlagenauslaufs wurde mit Hilfe einer Pumpe direkt aus dem Ablauf des Schönungsteichs entnommen. Die Expositions- und Kontrollansätze wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Die Replikate wurden mit „A“, „B“ und „C“ benannt.

Die überdachte Expositionsanlage befand sich auf dem Gelände der Kläranlage des „Abwasserverbandes Starnberger See“. An das Kanalisationsnetz waren zum Versuchszeitpunkt ca. 97.000 Einwohner angeschlossen. Für die Bemessung der Kanalisation wurde ein spezifischer Abwasseranfall von 200 l/Einwohner und Tag angenommen. Das Abwasser wird

zunächst mechanisch geklärt und nach dem Belebungsverfahren biologisch gereinigt. Die dritte Reinigungsstufe in Form einer chemischen Fällung (Simultanfällung mit Metallsalzen) wurde 1984 zur weitgehenden Eliminierung des Phosphates und zur Kapazitätserhöhung des Klärwerks installiert. Der 20000 m² große Nachreinigungsteich (Schönungsteich) dient vor allem der hygienischen Verbesserung des gereinigten Abwassers (Glauner, 1987).

Die Exposition erfolgte in 160-Liter-Glasaquarien (100 cm x 40 cm x 40 cm), welche, entsprechend den drei Ansätzen, in je drei Abteile á 53,3 Liter aufgeteilt waren [Kontrolle (K), 1:12 und 1:2] (siehe Abb. 1). Somit standen für *Rana temporaria* insgesamt neun Abteile zur Verfügung, in welche zu Beginn des Versuchs ca. 80 ml Grasfrosch-Laich eingebracht wurde. Die Anzahl der Kaulquappen von *Rana temporaria* wurde am 28.04.00 auf 120 pro Replikat reduziert. Die übrigen Kaulquappen wurden an die Entnahmestelle zurückgebracht. Für die Versuche mit Krallenfröschen wurde aufgrund einer natürlicherweise vorkommenden hohen Mortalität bei Kaulquappen dieser Art eine Tierzahl von ca. 400 pro Replikat eingesetzt.

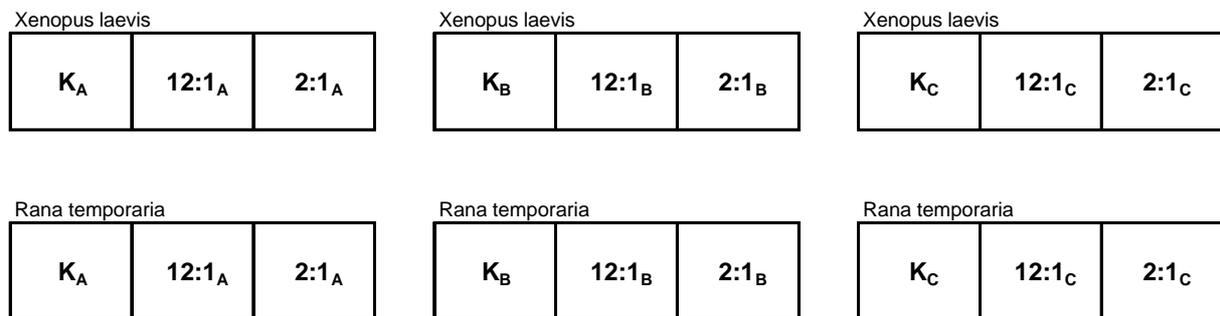


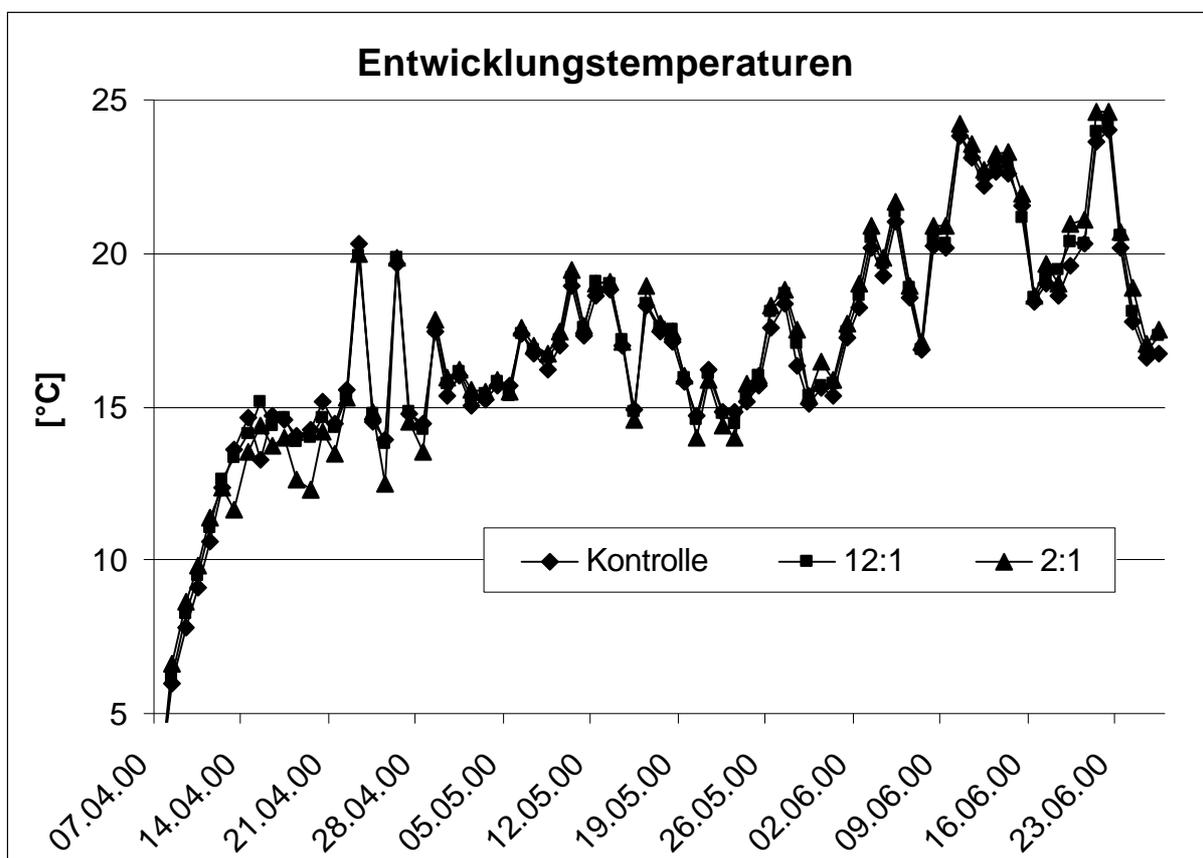
Abb. 1 Versuchsanordnung

Die Versuche wurden im Durchflussverfahren durchgeführt. Das Wasser aus der Wärm bzw. dem Kläranlagenauslauf wurde in ein Glasaquarium mit einem Überlauf gepumpt und von dort aus mittels Abimed-Minipuls-Schlauchpumpen (Isoversinic ®) in dem entsprechenden Mischungsverhältnis (siehe Tab. 4) in die einzelnen Abteile der Expositionsaquarien überführt. Letztere waren wiederum mit einem Überlauf versehen.

Tab. 4 Zulaufdaten der Testansätze

Mischungen	Abwasser [ml/min]	Würmwasser [ml/min]	Gesamtzulauf [ml/min]
Kontrolle-Würm	-	26,0	26,0
Abwasser:Wurm 1:2	8,6	17,2	25,8
Abwasser:Wurm 1:12	2,0	24,0	26,0

Bei *Xenopus laevis* wurde die Wassertemperatur in den Aquarien mittels einer Aquarienheizung (*Vitakraft*) in dem für diese Froschart geeigneten Temperaturbereich gehalten. Sie betrug konstant ca. 22°C. Zusätzlich waren diese Aquarien mit Sauerstoffpumpen (*Wisa, ASF Thomas GmbH, Wuppertal*) ausgestattet. Die Aquarien, in denen *Rana temporaria* gehalten wurde, waren nicht beheizt, da diese Art bei uns heimisch ist und somit die für eine normale Entwicklung erforderlichen Temperaturen gewährleistet waren. Sauerstoffpumpen wurden aufgrund der niedrigen Wassertemperaturen ebenfalls nicht benötigt.

**Abb. 2** Wassertemperaturverlauf in den Aquarien von *Rana temporaria*

Die Fütterung der Larven von *Rana temporaria* erfolgte mit handelsüblichem Fischfutter („Premium Tabs“, Sera; „TabiMin“, Tetra: eine Tablette/Tag/Replikat). Die Krallenfrösche

erhielten pro Tag und Replikat ca. 4g einer Mischung aus Trockeneigelb (70%), Brenneselpulver (20%) und Bierhefe (10%).

3.2.1.2. Haltung und Expositionsbedingungen nach Abschluss der Metamorphose

Die Grasfrösche wurden kurz vor Abschluss der Metamorphose im Stadium 41/42 (Gosner, 1960), welches durch das Erscheinen der Vordergliedmaßen gekennzeichnet ist, in insgesamt 18 Glas-Terrarien (80cm x 40 cm x 40 cm) umgesetzt. Somit wurden die Replikate nochmals aufgeteilt, da die Besatzdichte pro m² maximal 250 Tiere betragen sollte. Die Terrarien waren durch einen Dachüberstand geschützt. Die eine Hälfte der Terrarien stand auf der Nord-Seite, die andere auf der Süd-Seite und wurde durch eine grüne Verschattungsmatte für Teiche vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt. Die Tiere, die bis zum 12.06.00 das Stadium 41/42 erreicht hatten, kamen in die Terrarien auf der Nord-Seite, die später entwickelten Tiere kamen in die Terrarien auf der Süd-Seite. Die ersten Grasfrösche wurden am 30.05.00 in die Terrarien umgesetzt, die am spätesten entwickelten Tiere erreichten am 09.07.00 das Stadium 41/42.

Tab. 5 Anzahl der Tiere in den einzelnen Terrarien

Terrarien	n (Anzahl der Tiere/Replikat)								
	K _A	K _B	K _C	12:1 _A	12:1 _B	12:1 _C	2:1 _A	2:1 _B	2:1 _C
Nord-seite	70	35	49	68	87	52	67	54	65
Süd-seite	34	40	14	22	23	25	35	34	21

Den natürlichen Habitaten der Grasfrösche nachempfunden, wurden „Landzonen“ aus Moos und Schilfhalmen eingerichtet. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Tiere die meiste Zeit mit dem Wasser in Kontakt blieben, um eine möglichst kontinuierliche Exposition zu gewährleisten. Die Terrarien enthielten jeweils 3 Liter Wasser im entsprechenden Verdünnungsverhältnis (siehe oben). Das Wasser wurde mit Hilfe eines umgebauten Filtrationssystems (*Sartorius*), bestehend aus einem Kompressor und einem Unterdruckbehälter aus Edelstahl, täglich gewechselt (semi-statische Exposition). Das Wasser aus dem Kläranlagenablauf wurde aus einer 24 h-Sammelprobe (*Probennehmer PB10, WTW, Weilheim*) entnommen, um eventuell auftretende Konzentrationspeaks bestimmter Substanzen im Tagesverlauf auszugleichen. Die Fütterung erfolgte primär mit Wiesenplankton, welches mit einem Plank-

tonkescher mit langem Fangsack täglich gefangen wurde. Zusätzlich bekamen die Grasfrösche flugunfähige *Drosophilen* (*Fa. Hoch, Waldkirch*).

Die Krallenfrösche wurden ab dem Stadium 63 (Nieuwkoop und Faber, 1975) einzeln gehalten, da sie ab diesem Zeitpunkt eine kannibalische Lebensweise aufweisen. Dieses Entwicklungsstadium ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein vollständig entwickelter Vordergliedmaßen und eine bereits abgeschlossene Metamorphose des Kopfes. Lediglich der Schwanz ist noch nicht vollständig zurückgebildet. Die ersten Tiere erreichten dieses Stadium am 28.05.00, am 30.06.00 wurden die letzten Krallenfrösche umgesetzt. Die Haltung erfolgte in 400 ml-Glasgefäßen, die mit ca. 300 ml Expositionswasser in dem entsprechenden Verdünnungsverhältnis gefüllt waren. Die Gefäße standen auf Heizmatten (*Vitakraft*), um die entsprechende Wassertemperatur von 22°C zu gewährleisten. Das Wasser wurde täglich erneuert (siehe oben.). Die Fütterung erfolgte mit roten Mückenlarven (*Fa. Gula, Remseck*).

3.2.1.3. Erfassung von Entwicklungsdaten

Während der Exposition wurde zu bestimmten Zeitpunkten eine Bestimmung der vorliegenden Entwicklungsstadien durchgeführt, um eventuelle Unterschiede bezüglich der Entwicklung bei den unterschiedlich exponierten Tieren feststellen zu können.

Bei *Rana temporaria* wurden die Entwicklungsdaten im Rahmen des Expositionsversuchs zweimal bei jeweils 30 zufällig ausgewählten Tieren eines Replikates erfasst (26.04.00, 11.05.00). Die Stadienbestimmung erfolgte an Hand der Entwicklungstabelle von Gosner (1960). Zusätzlich wurde eine Bestimmung des Körpergewichts durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten zum Körpergewicht erfolgte mit Hilfe der SPSS Software. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Abwasser-exponierten und den Kontrolltieren wurde der Mann-Whitney-V-Test durchgeführt.

Bei *Xenopus laevis* wurde ebenfalls zweimal eine Stadienbestimmung durchgeführt (11.04.00; 15.05.00). Aufgrund der relativ hohen Stressanfälligkeit der Tiere wurden diese zur Untersuchung nicht aus den Aquarien entnommen, so dass das Körpergewicht nicht ermittelt werden konnte. Die Bestimmung der Entwicklungsstadien wurde anhand der Tabelle von Nieuwkoop und Faber (1975) vorgenommen.

3.2.1.4. Wasseranalytik

Das Abwasser und das Würmwasser wurden auf das Vorkommen der Xenooestrogene Nonylphenol (NP) und Octylphenol (OP) und der Hormone \bullet -Estradiol, Estron und Ethinylestradiol überprüft. Im Laufe des Versuchs wurden zehn 24 h-Mischproben genommen. Abwasserproben wurden direkt am Auslauf des Schönungsteichs der Kläranlage Starnberg entnommen, Würmwasserproben oberhalb des Kläranlagenauslaufs. Die Probenahme erfolgte mit dem Probennehmer PB10 (WTW, Weilheim). Für die Erstellung eines Tagesprofils wurden über 24 h mit Hilfe des am Kläranlagenauslauf fest installierten Probennehmers SPI (Maxx GmbH, Hirrlingen) Sammelproben entnommen.

Die Bestimmung der Hormone wurde von der Abteilung 6 „Stoffbewertung und Analytik“ des BayLfW durchgeführt. OP und NP wurden von der Firma GC-Analysen GmbH (Pöcking) bestimmt. Für die Analyse der Substanzen erfolgte zunächst eine Extraktion mit Hexan/Dichlormethan. Der anschließende Nachweis wurde mittels eines Gaschromatographen, welcher an einen massenselektiven Detektor gekoppelt ist (GC/MS), durchgeführt. Die Nachweisgrenze für die Hormone lag bei dem angewandten Verfahren bei 0,3 ng/l, für NP und OP bei 1 ng/l.

3.2.2. Gruppe II (Wielenbach)

Die Grasfrösche dieser Gruppe stammten aus einem unbelasteten Gewässer auf dem Areal der Versuchsanlage Wielenbach (Abtlg. 5, LfW) und dienten somit, neben den Kontrolltieren der Gruppe I, als weitere Kontrollgruppe. Es handelte sich dabei um ca. 1,5 Jahre alte Tiere, welche aus dem Gewässer gefangen und anschließend nach vorhergehender Betäubung getötet (siehe Kap. 3.6) wurden.

3.2.3. Gruppe III (Zusatzgruppen)

Zusätzliche Grasfrösche wurden von der eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG) in Dübendorf, Schweiz, zu Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um eine Mittellandpopulation und zwei hochalpine Populationen unterschiedlichen Alters, die im oben genannten Institut unter Laborbedingungen in Leitungswasser gehalten wurden. Die Untersuchung diente dem Vergleich von bei uns beheimateten Grasfröschen und Individuen aus anderen Habitaten wie zum Beispiel hochalpinen Regionen im Hinblick auf die Geschlechtsdifferenzierung.

Tab. 6 Herkunft der Zusatzgruppen

Gruppe	Herkunft des Laichs	Population	Zeitpunkt des Laichsammelns	Anzahl der Tiere
IIIa	Maloja	Hochlandpopulation	28.05.00	35
IIIb	Zürich	Mittellandpopulation	20.03.99	50
IIIc	Maloja	Hochlandpopulation	07.05.99	33

3.2.3.1. Haltungsbedingungen während des Larvenstadiums

Die Larven wurden in 4 Liter-Becken (31 x 21 x 11cm) aus Kunststoff gehalten. Das in den Becken verwendete Leitungswasser wurde zuvor jeweils einen Tag stehengelassen. Ein Wasserwechsel wurde alle 3-4 Tage durchgeführt. Die Besatzdichte betrug sechs Kaulquappen pro Becken. Die Fütterung erfolgte mit Spirulina-Tabletten ad libitum.

3.2.3.2. Haltungsbedingungen nach Abschluss der Metamorphose

Die Tiere wurden nach Abschluss der Metamorphose in 5 Liter-Becken überführt. Der Boden der Becken war mit wassergetränkter Baumwollwatte ausgelegt, die Wasserhöhe betrug 1 cm. Ein Wasserwechsel wurde ebenfalls alle 3-4 Tage mit Leitungswasser durchgeführt. Die Fütterung der Jungfrösche erfolgte mit Heimchen und flugunfähigen Drosophila.

3.3. Untersuchungsmaterial: Organgewinnung und histotechnische Organaufbereitung

Die Tiere der Gruppe I wurden am Ende der Versuchsperiode (Krallenfrösche: 10.-11.07.00; Grasfrösche: 17.-19.07.00), die übrigen Tiere zum geplanten Untersuchungszeitpunkt (10.'00), in tiefer Narkose (Betäubung mit Ethylenglycolmonophenylether, 0,8% per Inhalation) durch Dekapitation getötet. Die Tiere wurden gewogen und ihre Körperlänge gemessen. Anschließend wurden die Tiere zur pathologisch-anatomischen und histologischen Untersuchung der Organe obduziert. Die Obduktion wurde unter einem Stereomikroskop (SV 8, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette und einer Schere die Körperhöhle eröffnet. Nachdem man den Magen-Darm-Trakt etwas zu einer Seite gelegt hatte, wurden die Gonaden sichtbar. Nach Durchtrennung des Mesorchiums bzw. des Mesovariums konnten die Gonaden entnommen werden.

Für die histopathologischen Begleituntersuchungen bei Tieren der Gruppe I wurden von jeweils zehn Tieren pro Versuchsansatz zusätzlich folgende Organe entnommen: Haut, Magen, Darm, Lunge, Leber, Niere.

Tab. 7 Anzahl der Tiere pro Gruppe für die Gonadenhistologie

Gruppe	Art	Alter (Monate)	n (Anzahl der Tiere)
Ia	<i>Rana temporaria</i>	4	740
Ib	<i>Xenopus laevis</i>	4	307
II	<i>Rana temporaria</i>	4	62
IIIa	<i>Rana temporaria</i>	4	35
IIIb	<i>Rana temporaria</i>	18	50
IIIc	<i>Rana temporaria</i>	16,5	33

Die Gonaden wurden 3 h bei Raumtemperatur in einem Pikrinsäure-Formol-Eisessig-Gemisch nach Bouin (1897) fixiert. Die Bouin'sche Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Nach der Fixierung wurden die Gonaden in Leitungswasser gewässert und anschließend für die Einbettung in einem Entwässerungsautomaten (*Tissue-Tek VIP, Vogel Gießen, Deutschland*) in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol entwässert (2 x 70%, 2 x 96%, 3 x 100%, 2 x Xylol) und mit flüssigem Paraffin durchtränkt. Die Gonaden wurden in gleicher Ausrichtung in Paraffinblöckchen eingebettet und anschließend mit einem Mikrotom (manuelles Schlittenmikrotom, *Jung AG, Heidelberg, Deutschland*) in eine Dicke von 3 µm geschnitten. Die Schnitte wurden im Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden im Brutschrank bei 56 °C über Nacht getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol (2 x 10 min.) entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 96%, 70%) bis zum Aqua dest. (je 2 min.) rehydriert. Bei der sich daran anschließenden Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte zunächst in Hämatoxylin gefärbt (7 min.) und danach mit Leitungswasser abgespült. Zum Differenzieren erfolgte ein kurzes Eintauchen in HCl-Alkohol (1%ige HCl in 70%igem Alkohol). Es folgte Bläuen in Leitungswasser (10 min.) und Übertragen in Aqua dest. (2 min.). Danach wurden die Schnitte mit Eosin gegengefärbt (5 min.) und mit Aqua dest. abgespült. An die Färbung schloss sich eine Entwässerung der Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 2 x 96%, 2 x 100%) an. Nach Einbringen in Xylol (2 x 2 min.) wurden die Präparate mit Eukitt eingedeckt und mit einem Deckglas bedeckt.

Bouin'sche Lösung (Fixierungslösung)

gesättigte Pikrinsäurelösung	15 ml
35%iges Formol	5 ml
Eisessig	1 ml

Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Eosin G, Pulverform: *E. Merck, Darmstadt, Deutschland*

Essigsäure 100% (Eisessig): *E. Merck, Darmstadt, Deutschland*

Ethanol, absolut, reinst: *E. Merck, Darmstadt, Deutschland*

Eukitt: *Riedel-de Haen, München, Deutschland*

Formaldehydlösung min. 37%: *E. Merck, Darmstadt, Deutschland*

Mayers Hämalaulösung: *E. Merck, Darmstadt, Deutschland*

Paraffin (Histo Comp): *Vogel, Gießen, Deutschland*

Pikrinsäure krist. reinst.: *E. Merck, Darmstadt, Deutschland*

Salzsäure 25%: *E. Merck, Darmstadt, Deutschland*

Xylol (zur Analyse): *E. Merck, Darmstadt, Deutschland*

3.4. Lichtmikroskopie von Gonadengewebe

Die histologische Beurteilung der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnittpräparate erfolgte an einem Lichtmikroskop (*Zeiss Axiophot*). Die Befunde wurden photographisch dokumentiert (*Axiophot Photomikroskop, Zeiss, Oberkochen*).

Bei allen Tieren der Gruppen I -III wurde eine lichtmikroskopische Untersuchung von Gonadengewebe vorgenommen. Sowohl bei den Grasfröschen als auch bei den Krallenfröschen erfolgte zunächst eine Dokumentation der Normalmorphologie. Eine Bestimmung des Geschlechts wurde aufgrund definierter, geschlechtsspezifischer, morphologischer Kriterien durchgeführt. Zudem wurde eine Zuordnung des Reifegrades der Gonadenentwicklung basierend auf den in Kapitel 4.3, Tab. 15 aufgeführten Kriterien vorgenommen.

Bei Grasfröschen aus einer einheimischen Mittellandpopulation (Gruppe Ia, II), die Hermaphroditen-Stadien aufwiesen, wurde zusätzlich eine Einteilung der vorliegenden Transformationsstadien anhand morphologischer Kriterien (Kapitel 4.3, Tab. 16) vorgenommen. Weiterhin wurden die Gonaden auf das Auftreten von pathologischen Veränderungen untersucht. Die statistische Auswertung der lichtmikroskopisch ermittelten Befunde der Gruppen Ia und Ib wurde mit Hilfe des Programmpaketes SPSS[®] (Statistical Package for the Social Science), Version 8 durchgeführt. Die Analyse von Veränderungen zwischen den Gruppen im

Hinblick auf das Geschlechterverhältnis, den gonadalen Reifegrad, sowie dem Auftreten von Transformationsstadien erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test.

3.5. Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Vitellogenin-mRNA in vitro

Der Nachweis der Vg-mRNA erfolgte ausschließlich an Krallenfröschen der Gruppe Ib und wurde am Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei in Berlin durchgeführt. Von jeweils sechs männlichen und sechs weiblichen Tieren pro Replikat wurden Leberproben entnommen. Aus den Leberproben wurde die mRNA mittels phenolischer Extraktion isoliert und danach mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierbei wurde auch die Vitellogenin-mRNA in cDNA umgesetzt. Durch den Einsatz spezifischer Primer wurde ein bekannter Abschnitt der cDNA durch eine „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) vervielfältigt. Anschließend wurde die vorhandene spezifisch vermehrte Teilsequenz der Vitellogenin-cDNA mittels Gelelektrophorese in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Die amplifizierte cDNA fluoresziert unter UV-Licht entsprechend der vorhandenen cDNA-Menge, in der sich Ethidiumbromid eingelagert hat und kann so densitometrisch mit einem Imageanalyzer bestimmt werden. Um die umgesetzte RNA-Menge zu erfassen musste, als interner Standard ein sogenanntes „housekeeping protein“, dessen mRNA nicht durch die Exposition und die Behandlung beeinflusst wurde, parallel zur Bestimmung der Vitellogenin-PCR ebenfalls in einer PCR vermehrt und gemessen werden. Für die Untersuchung wurde der Elongationsfaktor 1 α als „housekeeping factor“ benutzt.

3.6. Transmissions-Elektronenmikroskopie von Gonadengewebe

Die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde an Gonaden von 6 subadulten und 15 juvenilen Grasfröschen durchgeführt. Von den Gonaden wurden jeweils 1mm x 1mm große Proben genommen. Diese wurden in die Fixierlösung nach Karnovsky (1965) (2% Paraformaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer pH 7,2) verbracht. In diesem Fixativ verblieben die Proben über Nacht bei 4°C. Nach dem Abpipettieren des Fixiermittels und dreimaligem Wechseln des 0,1M Natriumcacodylatpuffers wurden die Proben mit 1% Osmiumtetroxid und 1,5% Kaliumferrocyanid 2h bei 4°C vorkontrastiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen in 0,1M Natriumcacodylat für jeweils 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 3 x absoluter Äthanol je 30 Minuten) dehydriert. Daraufhin wurden die Proben zunächst in Pro-

pylenoxid (2 x 15 min), anschließend in Propylenoxid:Epon 2:1 (1h) und dann über Nacht in eine Mischung aus Propylenoxid:Epon 1:1 überführt. Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst für eine Stunde in reines Epon verbracht. Nach dem Gießen der Gelatine kapseln erfolgte die Polymerisierung bei 60 °C über einen Zeitraum von 24h. Mit einem Ultramikrotom (*Ultracut E, Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich*) wurden zunächst Semidünnschnitte (1µm) angefertigt, mit Methylenblau nach der Methode von Richardson (1960) gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Geeignete Proben wurden ultradünn (60 nm) geschnitten, auf Kupfergrids (*Fa. SSI, München, Deutschland*) aufgefangen und mit gesättigtem Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds (1963) kontrastiert.

Die Auswertung der Ultradünnschnitte und die fotografische Darstellung erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop (*EM 902; Zeiss, Oberkochen, Deutschland*).

3.6.1. Für die Transmissionselektronenmikroskopie verwendete Reagenzien

Natriumcacodylat: *E. Merck, Darmstadt, Deutschland*

Lösung A: $\text{Na}(\text{CH}_3)_2 \text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ 8,56 g in 200 ml Aqua dest. lösen

Lösung B: HCl 0,2 M

Gebrauchslösung: Lösung A 50ml
 Lösung B 4,2ml
 Aqua dest. ad 200ml

Stammlösung: 10% Paraformaldehyd

Paraformaldehyd 10 g
Aqua dest. ad 100 ml
NaOH 1M 6 Tropfen

Aqua dest mit Paraformaldehyd bei 60 bis 70°C erwärmen bis dieses sich gelöst hat, NaOH hinzugeben und gut rühren bis sich alles gelöst hat.

Gebrauchslösung:

Karnovsky Stock 4 ml
GAH 8% 6 ml (*Polysciences*)
Cacodylatpuffer 0,2 M 10 ml

Epon (Polysciences):

Poly/Bed 812	16 ml
DDSA	10 ml
NMA	9 ml
DMP-30	0,3-0,5 ml

3.7. Immunhistochemie an Gonadengewebe

Die immunhistochemischen Färbung wurden bei 14 Gonadenpräparaten von *Rana temporaria* (Tab. 8) durchgeführt, welche zuvor lichtmikroskopisch untersucht wurden. Acht Gonadenpräparate stammen von Tieren der Gruppe I (Expositionsversuch Starnberg) und sechs von Tieren der Gruppe II (Wielenbacher Kontrollgruppe).

Tab. 8 Präparate für die Immunhistochemie

Nr.	Gruppe	Alter (Monate)	Geschlecht
1	II	18	M
2	II	18	W
3	II	18	HA I
4	II	18	W
5	II	18	W
6	II	18	W
7	Ia	4	W
8	Ia	4	W
9	Ia	4	W
10	Ia	4	HA I
11	Ia	4	W
12	Ia	4	HA I
13	Ia	4	HA II
14	Ia	4	HA I

M: männlich, W: weiblich, HA I: Hermaphrodit im Transformationsstadium I

HA II: Hermaphrodit im Transformationsstadium II

Zur immunhistochemischen Darstellung der Antigene Laminin, ZP3• (Zona pellucida 3•), Zona pellucida 3• (ZP3•), ACE (Angiotensin-Converting-Enzym) und SMA (Smooth-Muscle-Actin) im Gonadengewebe der Grasfrösche kam die indirekte Avidin-Biotin-Komplex-Technik nach Hsu et al. (1981) zur Anwendung. Bei dieser Methode wird eine Lösung mit verdünntem, unkonjugiertem Primärantikörper auf den Schnitt aufgetragen, damit dieser mit dem nachzuweisenden Antigen reagiert. An den Primärantikörper bindet ein zweiter biotinylierter Antikörper. Dieser ist spezifisch gegen die Immunglobuline der Tierart gerichtet, aus welcher

der Primärantikörper stammt. Anschließend wird ein Avidin-Biotin-Komplex (ABC) hinzugefügt, an dessen Biotinkomponente der histochemisch darstellbare Enzymmarker Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. Nun wird als Substrat DAB (Diaminobenzidin) hinzugefügt, um die Reaktion der Peroxidase farblich darzustellen und somit das entsprechende Antigen zu lokalisieren.

3.7.1. Materialien

Antiseren

- Primärantikörper: Maus-anti- α -Aktin (*Dako, Dänemark*)
(Verdünnung: 1:40 in *Dako Antibody Diluent*)
- Sekundärantikörper: Anti-Maus-IgG (biotinyliert) vom Kaninchen, (*Dako, Dänemark*)
(Verdünnung: 1:300 in PBS-Puffer)
- Primärantikörper: Aviäre-anti-Laminin 743 (88) Iyo. (Verdünnung: 1:500 in PBS-Puffer)
Aviäre-anti-ACE 765 (34) Iyo. (Verdünnung: 1:500 in PBS-Puffer)
Aviäre-anti-ZP3• 776 (111) Iyo. (Verdünnung:1:000 in PBS-Puffer)
Aviäre-anti-ZP3• 763 (33) Iyo. (Verdünnung:1:000 in PBS-Puffer)
- Sekundärantikörper: Anti-Huhn-IgG (biotinyliert) vom Kaninchen (*Rockland*)
(Verdünnung: 1:400 in PBS-Puffer)

Avidin-Biotin-Testkits

Streptavidin ABCComplex/HRP (Horseradish Peroxidase) (*Dako Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland ;K 377*):

ABC nach Angabe des Herstellers aus Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 herstellen.

Verwendete Pufferlösungen

Tris-Puffer (0,05 M) zur Herstellung der Diaminobenzidin(DAB)-Lösung

6,1 g Tris (Trishydroxymethylaminomethan) wurden in 50 ml Aqua dest. gelöst. 37 ml HCl werden hinzu gegeben und die Lösung mit Aqua dest. auf einen Liter Endvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 6,8 eingestellt.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Herstellung der Stammlösung (20fach konzentriert):

Natriumchlorid (NaCl)	160 g
Kaliumchlorid (KCl)	4 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	4 g
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	56 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Einstellen des pH-Wertes mit Salzsäure (HCl) bzw. Natronlauge (NaOH) auf pH 7,41-7,46.

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wird ein Teil Stammlösung mit 19 Teilen Aqua dest. verdünnt.

Substrat-Chromogen-Lösung, Gegenfärbung

H₂O₂-Diaminobenzidin (DAB)-Pufferlösung (zur Detektion der Meerrettichperoxidase)

Diaminobenzidin (DAB)	50 mg
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	100 ml
30%iges Hydrogenperoxid (H ₂ O ₂)	50 µl

Hämalaun nach Mayer (Kerngegenfärbung)

Hämatoxylin	1,0 g
Natriumiodat	0,2 g
Kaliumalaun	50 g
Aqua dest	ad 1000 ml
Chloralhydrat	50 g
Zitronensäure	2.0 g

Hämatoxylin, Natriumiodat und Kaliumalaun unter Erwärmung in Aqua dest. lösen; Chloralhydrat und Zitronensäure hinzufügen.

3.7.2. Durchführung

Die Objektträger wurden über Nacht bei 56°C im Brutschrank inkubiert, um die Entparaffinierung zu erleichtern und die Antigenreaktion zu verbessern. Anschließend erfolgte das Entparaffinisieren (2 x Xylol, 10 min) und die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100%, 1 x 96%, 1 x 70% Ethanol, 10 min) mit anschließendem Spülen in Aqua dest. Die Hemmung der endogenen Peroxidase wurde durch Inkubation der Objektträger mit 50 ml Hydrogenperoxid plus 150 ml Aqua dest. (10 min bei Raumtemperatur) und anschließendem Spülen unter fließendem Leitungswasser (10 min) erreicht. Danach erfolgte ein dreima-

liges Spülen in PBS-Puffer, pH 7,4, (je 5 min). Um eine unspezifische Hintergrundfärbung möglichst gering zu halten, wurden die Schnitte mit 100 µl normalem Kaninchenserum (*DAKO Protein Block Serum-Free, Hamburg*) überschichtet (10 min bei Raumtemperatur). Das Serum wurde anschließend abdekantiert. Danach erfolgte ein Bedecken der Schnitte mit der verdünnten Primäntikörperlösung (siehe Antiseren) und eine Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei 5°C (Primäntikörper: Laminin, ZP3•, ZP3• und ACE) bzw. eine Stunde bei Raumtemperatur (Primäntikörper: SMA). Nachdem die überschüssigen Primäntikörper durch Spülen mit PBS-Puffer, pH 7,4 entfernt wurden (3 x je 5 min), wurde in PBS-Puffer verdünnte Sekundäntikörper (siehe Antiseren) aufpipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte wiederum ein Dekantieren und dreimaliges Spülen in PBS (je 5 min), um die Reste vollständig zu entfernen. Danach wurden die Sekundäntikörper durch einen Streptavidin-Biotin-Horseradish-Peroxidase-Komplex (*Dako*) markiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde der überschüssige Anteil durch dreimaliges Spülen (je 5 min) mit PBS-Puffer entfernt. Anschließend erfolgte die Darstellung der Antigen-Antikörperreaktion mittels H₂O₂-DAB(chromogen)-Substratlösung (Graham und Karnovsky, 1966). Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur war die gewünscht Farbintensität erreicht. Die Enzymreaktion wurde durch Spülen mit PBS-Puffer und Leitungswasser gestoppt. Zum Nachweis von ZP3•, ZP3•, ACE und SMA wurden die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt (30 sek) und 10 Minuten mit Leitungswasser gespült. Der anschließenden Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 70%, 1 x 96%, 2 x 100%, je 5 min) bis zum Xylol (2 x 10 min) folgte das Eindecken mit Eukitt (*Riedel-de Haen AG*).

3.8. Toxikologische Untersuchungen-Histopathologie

An je zehn Grasfröschen und Krallenfröschen pro Testansatz (Gruppe Ia und Ib) wurden histopathologische Untersuchungen von Niere, Leber, Lunge, Magen-Darm-Trakt und Haut durchgeführt, um mögliche toxische Einflüsse des Abwassers auf den Gesundheitszustand der Tiere mit zu erfassen. Die Organe wurden nach der Entnahme in 4 %igem, neutral gepufferten Formalin fixiert. Die weitere histotechnische Verarbeitung erfolgte wie unter Kap. 3.3 beschrieben. Zum Nachweis von Glykogen in der Leber wurde zusätzlich eine PAS-Färbung (Perjodsäure Schiff Reaktion) durchgeführt. Die histopathologische Befunderhebung erfolgte an einem *Leitz Orthoplan* Mikroskop. Histopathologische Veränderungen wurden protokolliert und photographisch festgehalten (*Photoautomat Wild MPS 46*).

4. Ergebnisse

4.1. Wasseranalytik des Expositionsversuches Starnberg (Gruppe II)

4.1.1. Ergebnisse der chemischen Analyse des Würmwassers

Die Ergebnisse der chemischen Analysen von zehn Würmwasserproben, die während der Dauer des Expositionsversuches vom 20.04.00 bis 20.07.00 genommen wurden, finden sich in Tab. 9. Bei den Proben 1, 2 und 3 erfolgte auf Grund der sehr hohen Alkylphenolwerte eine Doppelbestimmung (1/13, 2/14 und 3/15). In die grafischen Darstellungen (Abb. 3, Abb. 4) ging der Mittelwert der Doppelbestimmung ein.

Tab. 9 Analyseergebnisse des Würmwassers

Probennummer	Datum	NP [ng/l]	OP [ng/l]	β-Estradiol [ng/l]	Estron [ng/l]	EE ₂ [ng/l]
1/13	20.04.00	150/160	28/23	< 0,3 / < 0,3	0,5/ 1	< 0,3/ < 0,3
2/14	02.05.00	155/200	34/42	< 0,3/ 0,4	0,3/ < 0,3	< 0,3/ 0,5
3/15	17.05.00	1000/1000	200/200	0,3/ 1	0,3/ 0,7	< 0,3/ 1,1
4	25.05.00	120	52	< 0,3	0,3	< 0,3
5	07.06.00	240	115	< 0,3	0,3	< 0,3
6	15.06.00	250	49	< 0,3	2	< 0,3
7	27.06.00	190	63	< 0,3	0,6	< 0,3
8	06.07.00	13	1,8	< 0,3	< 0,3	< 0,3
9	13.07.00	13	1,3	0,5	0,5	0,4
10	20.07.00	21	2,6	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Minimalwert		13	1,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Maximalwert		1000	200	1	2	1,1

NP: Nonylphenol, OP: Octylphenol, EE₂: Ethinylestradiol;

In der grafischen Darstellung (Abb. 3) der Konzentrationen von Nonylphenol und Octylphenol im Würmwasser ist deutlich sichtbar, dass die untersuchten Proben vom 02.05.00 bis zum 25.05.00 relativ hohe Konzentrationen dieser Substanzen aufweisen. Die Konzentrationen waren am 17.05.00 am höchsten und erreichten Werte von 1000 ng/l NP und 200 ng/l OP. Danach sanken sie wieder auf deutlich niedrigere Werte ab. Ab dem 06.07.00 lagen

diese für Nonylphenol zwischen 13 und 21 ng/l und für Octylphenol zwischen 1,3 und 2,6 ng/l.

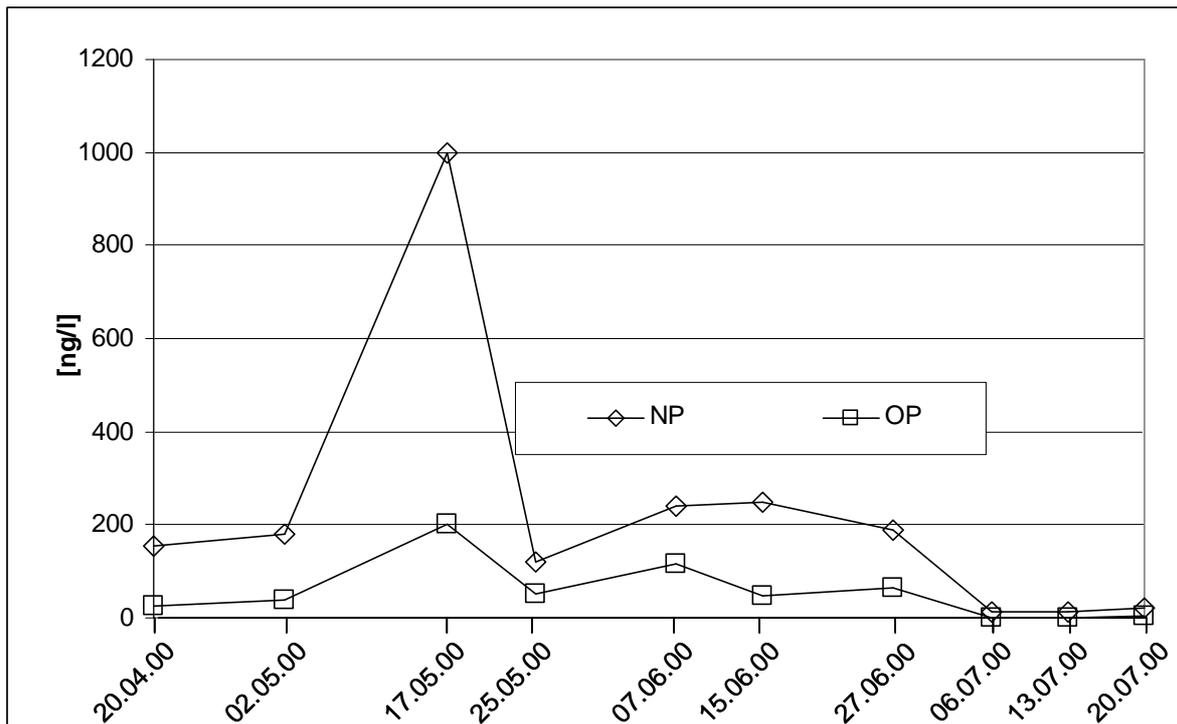


Abb. 3 Verlauf der Konzentrationen von Nonylphenol (NP) und Octylphenol (OP) im Würmwasser während der Dauer des Expositionsversuches

In Abb. 4 sind die Konzentrationen der Hormone 17 β -Estradiol, Estron und Ethinylestradiol im Würmwasser während der Dauer der Exposition grafisch dargestellt. Werte unterhalb der Nachweisgrenze von 0,3 ng/l liegen auf der X-Achse.

•-Estradiol war bei sieben von zehn Proben nicht nachweisbar. Bei zwei Proben lag die Konzentration knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Bei der Probe Nr. 3 ergab die erste Analyse eine Konzentration von 0,3 ng/l, die zweite hingegen eine Konzentration von 1 ng/l. Die Untersuchung auf Estron ergab bei acht Proben eine nachweisbare Konzentration. In der Würmwasserprobe vom 15.06.00 wurde eine Konzentration von 2 ng/l gemessen, in den übrigen Proben lagen die Konzentrationen zwischen 0,3-1 ng/l. Die Probe Nr. 2 ergab bei der ersten Messung eine Konzentration von 0,3 ng/l, bei der zweiten Messung lag Estron unterhalb der Nachweisgrenze.

Ethinylestradiol wurde nur in drei Fällen nachgewiesen (Proben 14, 15 und 8), wobei die Proben Nr.2 und 3 ein negatives Ergebnis erbrachten und erst die zweite Analyse (Nr.14 und 15) Konzentrationen von 0,5 ng/l bzw. 1,1 ng/l ergab. Bei Probe Nr. 8 lag die Konzentration von EE₂ mit 0,4 ng/l knapp über der Nachweisgrenze.

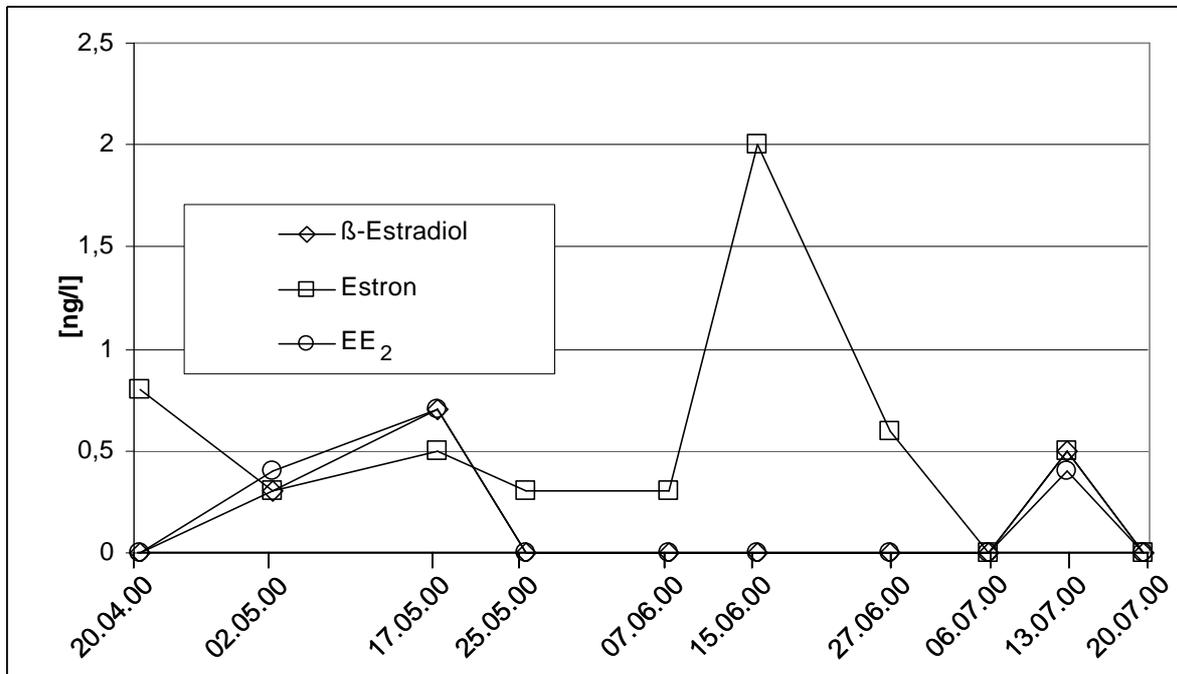


Abb. 4 Verlauf der Konzentrationen der Hormone 17 β -Estradiol, Estron und Ethinylestradiol (EE₂) im Wärmwasser während der Dauer des Expositionsversuches

4.1.2. Ergebnisse der chemischen Analyse des Abwassers

Während der Dauer des Expositionsversuches wurden vom Kläranlagenauslauf zehn Wasserproben entnommen (Nr. 1-10). Die Ergebnisse der chemischen Analyse des Abwassers sind in Tab. 10 zusammengefasst und in Abb. 5 und Abb. 6 grafisch dargestellt.

Die Analyse von Nonylphenol ergab Konzentrationen zwischen 23 ng/l und 290 ng/l. Somit sind deutliche Konzentrationsschwankungen zu verzeichnen. Wie in Abb. 5 dargestellt, wurden am 07.06.00 und am 20.07.00 NP-Höchstwerte von 250 ng/l und 290 ng/l gemessen.

Auch die Octylphenol-Werte wiesen eine breite Schwankung auf. So überstieg der Maximalwert den Minimalwert um das achtfache, die Konzentrationen für diese Substanz lagen während des Versuchszeitraums zwischen 2 ng/l und 16 ng/l.

Bezüglich des Vorhandenseins von natürlichen und synthetischen Hormonen wurde im Kläranlagenabwasser bei sieben von zehn Proben das Hormon β -Estradiol nachgewiesen. Bei fünf Proben lag die Konzentration mit 0,4-0,7 ng/l knapp über der Nachweisgrenze, zweimal wurden Werte über 1 ng/l gemessen (1,4 ng/l, 1,2 ng/l).

Estron war in sechs von zehn Proben nachweisbar. Dabei lag die Konzentration in drei Fällen mit 0,3-0,6 ng/l knapp oberhalb der Nachweisgrenze, in weiteren drei Proben wurden Konzentrationen zwischen 1 ng/l und 1,2 ng/l bestimmt.

Ethinylestradiol wurde auch im Kläranlagenabwasser nur in drei von 10 Proben nachgewiesen. Die Analyseergebnisse für diese Substanz ergaben Konzentration zwischen 0,3 ng/l und 0,8 ng/l.

Tab. 10 Ergebnisse der Abwasseranalytik

Probennummer	Datum	NP [ng/l]	OP [ng/l]	β-Estradiol [ng/l]	Estron [ng/l]	EE ₂ [ng/l]
1	20.04.00	46	16	0,5	1	< 0,3
2	02.05.00	53	11	0,6	1,2	< 0,3
3	17.05.00	45	9,5	1,4	1,2	0,8
4	25.05.00	110	11	0,4	< 0,3	< 0,3
5	07.06.00	250	5,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3
6	15.06.00	120	9,7	< 0,3	0,5	< 0,3
7	27.06.00	28	2,9	1,2	< 0,3	< 0,3
8	06.07.00	23	2	< 0,3	< 0,3	< 0,3
9	13.07.00	68	4,7	0,7	0,3	0,3
10	20.07.00	290	8,9	0,5	0,6	0,7
11	01.08.00	110	6,9	0,5	< 0,3	0,4
12	01.08.00	45	10	0,7	0,5	0,8
Minimalwert		23	2	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Maximalwert		290	16	1,4	1,2	0,8

NP: Nonylphenol, OP: Octylphenol, EE₂: Ethinylestradiol

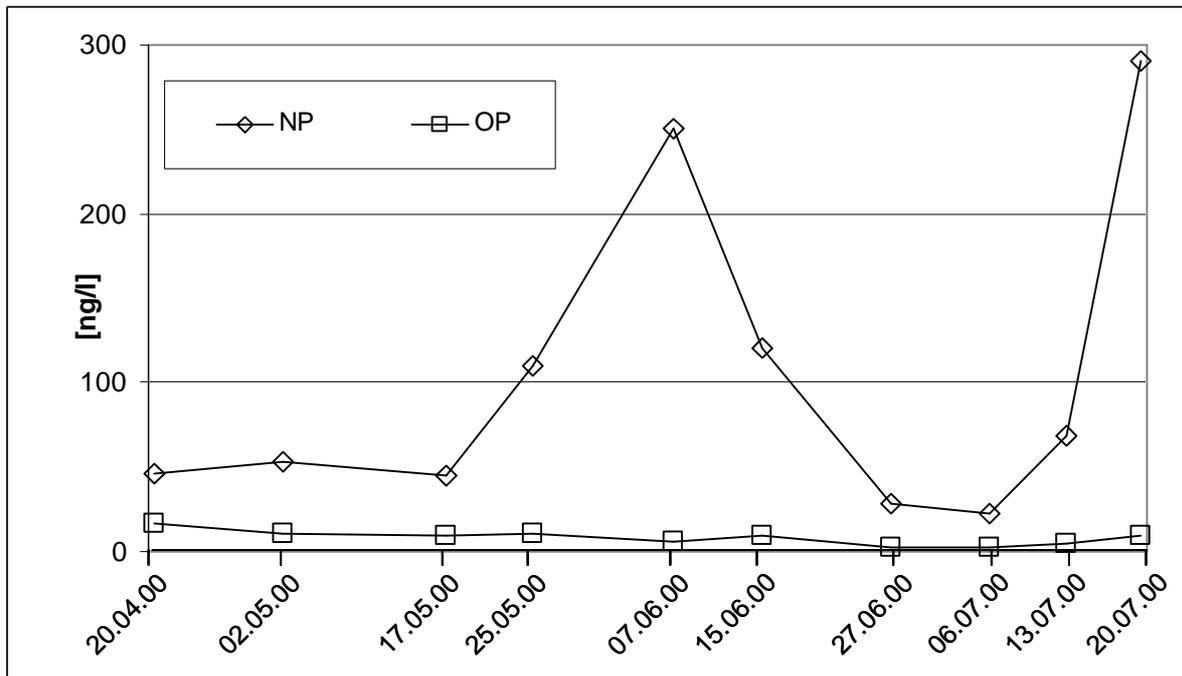


Abb. 5 Verlauf der Konzentrationen von Nonylphenol (NP) und Octylphenol (OP) im Abwasser während der Dauer des Expositionsversuches

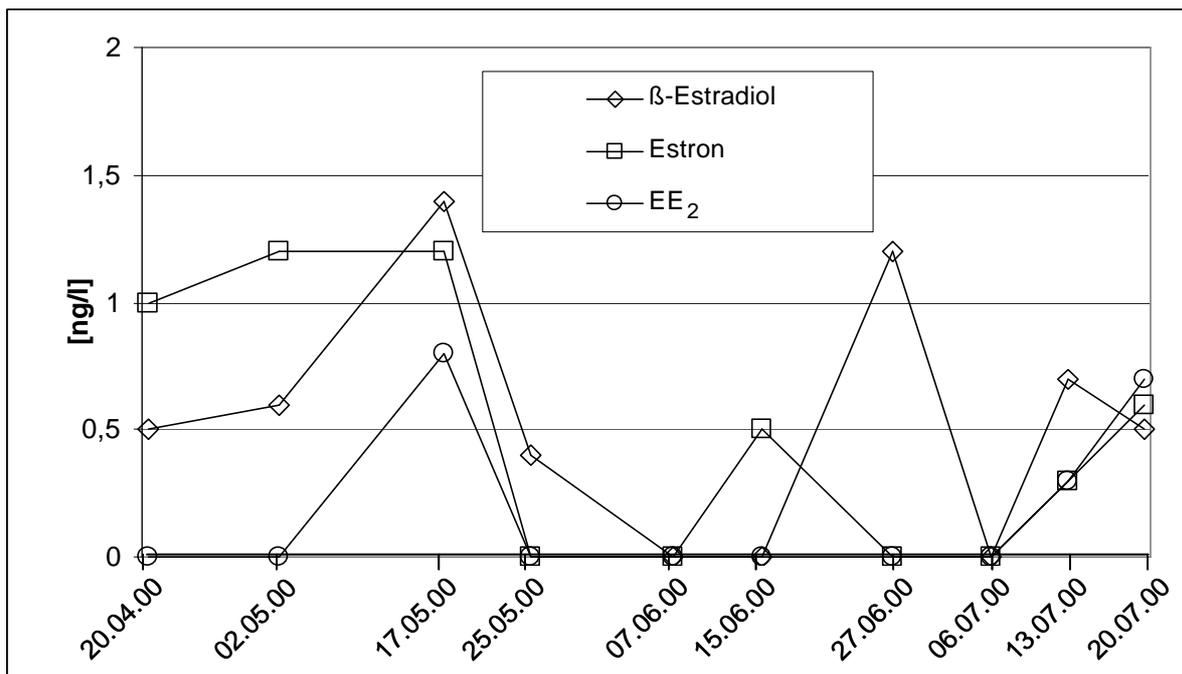


Abb. 6 Verlauf der Konzentrationen der Hormone 17β-Estradiol, Estron und Ethinylestradiol (EE₂) im Abwasser während der Dauer des Expositionsversuchs

4.1.3. Chemisches Abwasserprofil über 24 Stunden

Zur Erfassung der Tagesrhythmik einer östrogenen Belastung des Abwassers wurden am 24. und 25.05.00 in 2-stündigem Abstand Abwasserproben gezogen und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 aufgeführt und in Abb. 7 und Abb. 8 grafisch dargestellt.

Tab. 11 Ergebnisse der Abwasseranalytik (24h Sammelprobe)

Uhrzeit	Datum	NP [ng/l]	OP [ng/l]	β-Estradiol [ng/l]	Estron [ng/l]	EE ₂ [ng/l]
6-8 Uhr	24.05.00	77	6,7	< 0,3	0,7	< 0,3
8-10 Uhr	24.05.00	55	3,4	< 0,3	1,3	< 0,3
10-12 Uhr	24.05.00	100	4,7	0,5	1,8	0,6
12-14 Uhr	24.05.00	49	8,5	1,2	0,9	0,4
14-16 Uhr	24.05.00	56	8,2	2,7	1	< 0,3
16-18 Uhr	24.05.00	60	3,7	< 0,3	1,5	< 0,3
18-20 Uhr	24.05.00	71	5,8	0,4	0,4	< 0,3
20-22 Uhr	24.05.00	95	10	0,5	1,5	0,8
22-24 Uhr	24.05.00	60	12	0,4	0,7	0,3
24-2 Uhr	25.05.00	40	8	0,3	1	0,4
2-4 Uhr	24.05.00	43	4,1	< 0,3	< 0,3	< 0,3
4-6 Uhr	24.05.00	29	9,3	0,4	0,4	< 0,3
Minimalwert		29	3,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Maximalwert		100	12	2,7	1,8	0,8

NP: Nonylphenol, OP: Octylphenol, EE₂: Ethinylestradiol

Sowohl Nonyl- und Octylphenol als auch die Hormone zeigten deutliche tageszeitliche Konzentrationsschwankungen. Die Konzentrationen von Nonylphenol lagen zwischen 29 ng/l und 100 ng/l. Diese Substanz erreichte zwischen 10 und 12 Uhr mit 100 ng/l und 20 und 22 Uhr mit 95 ng/l zwei deutliche Spitzenwerte. Um zwei Stunden verschoben zeigte Octylphenol zwischen 12 und 14 Uhr (8,5 ng/l) und 22 und 24 Uhr (12 ng/l) ebenfalls Konzentrationspeaks. Der Minimalwert für Octylphenol lag bei 3,4 ng/l, der Maximalwert bei 12 ng/l.

Von den Hormonen wurde 17β-Estradiol bei acht von zwölf Proben nachgewiesen. In den meisten Fällen lag die Konzentration dieser Substanz mit 0,3-0,5 µg knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Spitzenwerte von 1,2 ng/l und 2,7 ng/l traten zwischen 12 und 16 Uhr auf. Estron war im gesamten Tagesverlauf mit Ausnahme einer Probe in nachweisbaren Konzentrationen zwischen 0,4 ng/l und 1,8 ng/l vorhanden.

Ethinylestradiol war in fünf der zwölf Proben nachweisbar. Zwischen 10 und 14 Uhr (0,6 ng/l, 0,4 ng/l) Uhr und zwischen 20 und 2 Uhr (0,8 ng/l, 0,3 ng/l, 0,4 ng/l) wurden Konzentrationen über der Nachweisgrenze ermittelt.

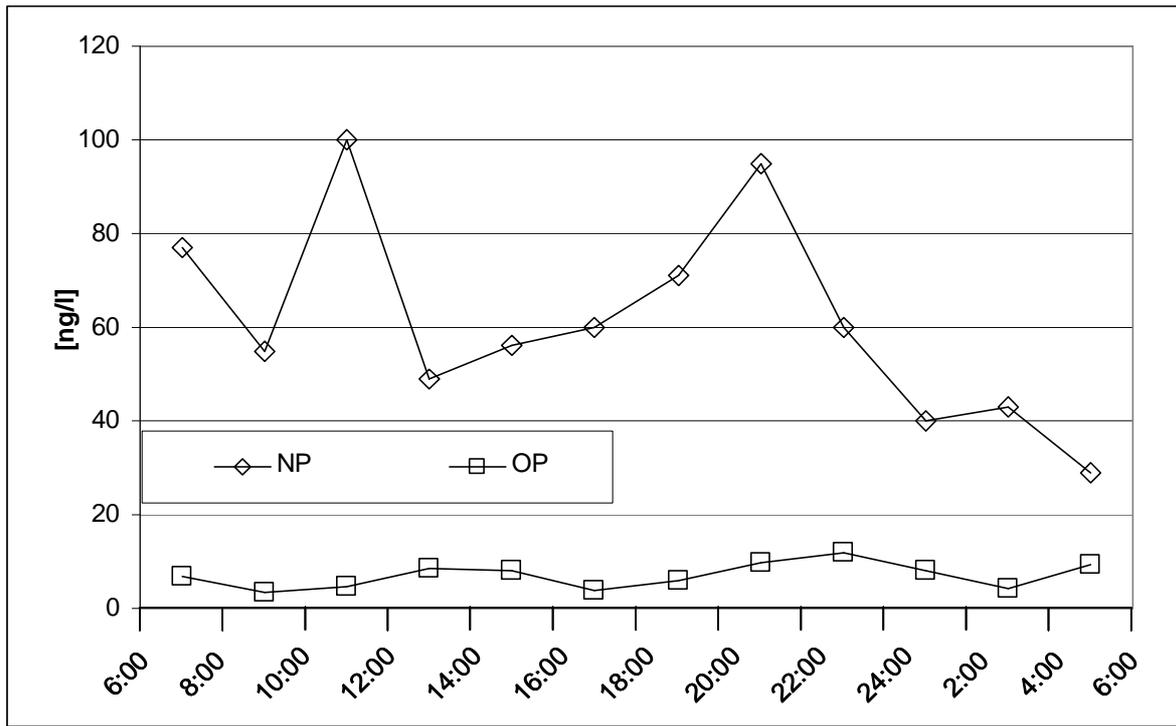


Abb. 7 24 h Verlaufsprofil der Konzentrationen von Nonylphenol (NP) und Octylphenol (OP) im Abwasser vom 24./25.05.00

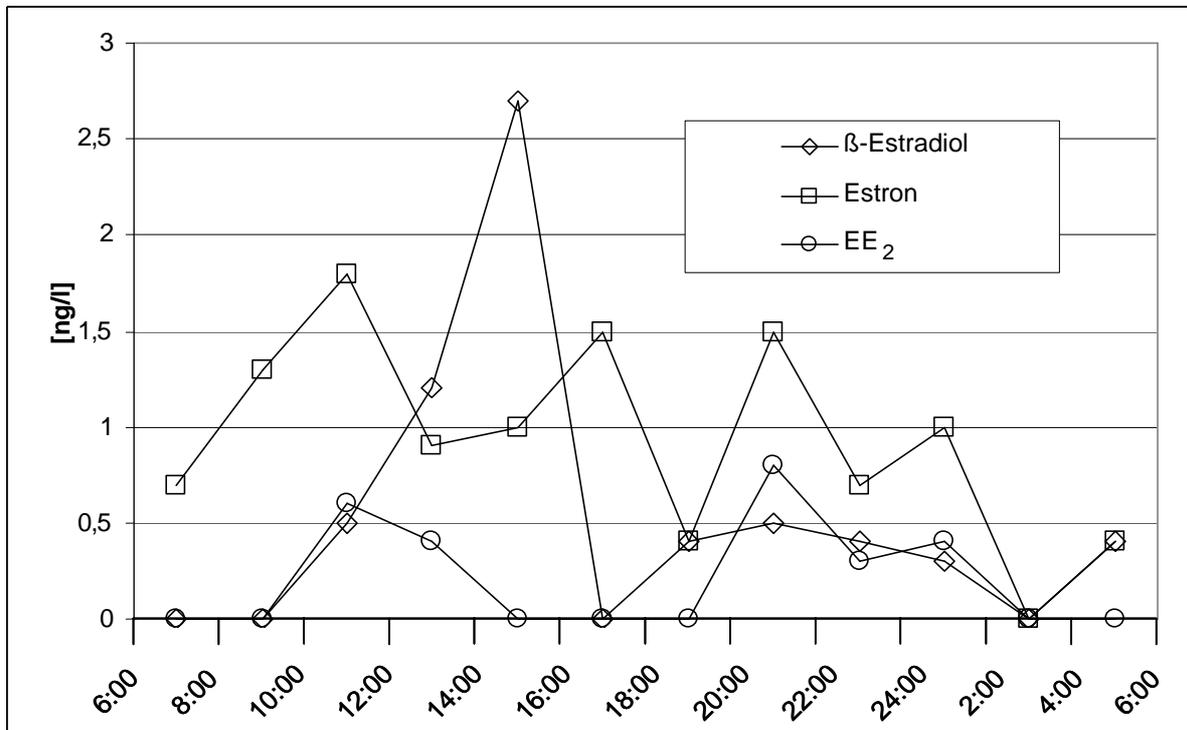


Abb. 8 24 h Verlaufsprofil der Konzentrationen von β -Estradiol, Estron und Ethinylestradiol (EE_2) im Abwasser vom 24./25.05.00

4.2. Bestimmung der Entwicklungsstadien bei der Gruppe I (Expositionsversuch Starnberg)

4.2.1. *Rana temporaria* (Gruppe Ia)

Die erste Untersuchung zur Larvalentwicklung bei Grasfröschen erfolgte am 26.04.00 (siehe Tab. 12, Abb. 9). Von jedem Replikat wurden 40 Tiere nach dem Zufallsprinzip entnommen und das jeweils vorliegende Entwicklungsstadium an Hand des Bestimmungsschlüssels von Gosner (1960) bestimmt. Gleichzeitig wurde zu diesem Termin die Anzahl der Tiere in jedem Replikat auf 120 reduziert. Die Stadienbestimmung ergab bei den Kontrolltieren, die in Würmwasser gehalten wurden, im Mittel das Vorliegen von Stadium 27 (Gosner, 1960). Dieses Larvalstadium ist durch das beginnende Auswachsen der Hintergliedmaßen gekennzeichnet. Das Verhältnis Länge/Durchmesser der Hintergliedmaßenstummel betrug 0,5. Die Tiere der 12:1- und 2:1-Versuchsgruppe wiesen im Mittel ebenfalls Stadium 27 der Entwicklung auf.

Tab. 12 Entwicklungsdaten vom 26.04.00

Replikat	Stadium [Gosner]		Gewicht [mg]	
	Mittelwert (n=40)	Standardabw.	Mittelwert (n=40)	Standardabw.
K _A	26,63	0,77	45,8	14,0
K _B	27,2	0,46	43,1	11,5
K _C	27,13	0,56	41,7	9,5
K-ges	26,98	0,66	43,5	11,8
12:1 _A	27,4	0,63	45,9	14,1
12:1 _B	26,73	0,55	30,4	8,7
12:1 _C	27,25	0,59	49,2	11,8
12:1-ges.	27,13	0,65	41,8	14,2
2:1 _A	27,43	0,68	47,3	12,4
2:1 _B	27,38	0,54	47,0	15,9
2:1 _C	27,3	0,97	53,8	28,6
2:1-ges.	27,37	0,74	49,4*	20,2

* p<0,05

Die Bestimmung des Körpergewichts ließ eine hohe individuelle Variabilität innerhalb der Gruppen erkennen. Das mittlere Körpergewicht betrug bei der Kontrolle 43,53 mg ±11,79, bei Tieren der 12:1-Abwasserverdünnung 41,83 mg ±14,22 und in der 2:1 exponierten

Gruppe 49,37 mg \pm 20,18. Dies bedeutet einen schwach signifikanten Anstieg des Körpergewichts der 2:1-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

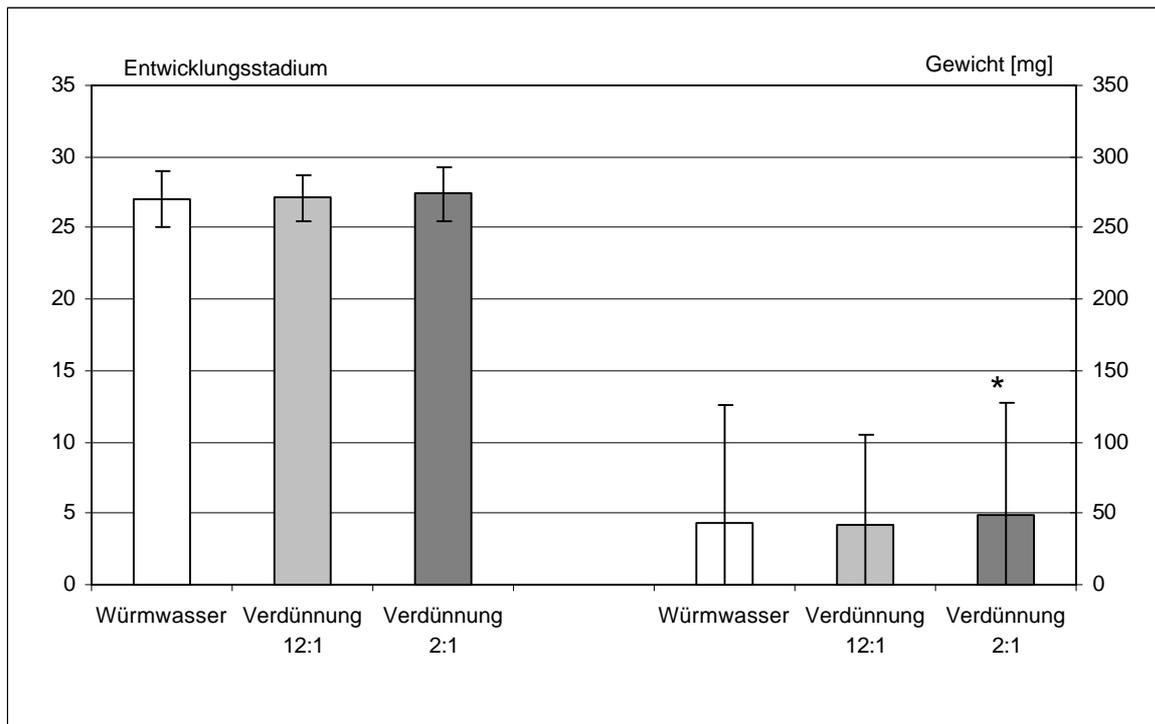


Abb. 9 Entwicklungsstadien nach Gosner (1960) und Körpergewicht von *Rana temporaria* am 26.04.00; * $p < 0,05$

Die zweite Probennahme zur Stadienbestimmung fand am 11.05.00 statt (Tab. 13, Abb. 10). Die Bestimmung wurde bei 30 zufällig ausgewählten Tieren durchgeführt. Die Stadienbestimmung nach Gosner (1960) ergab sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Abwasserverdünnungen ausgesetzten Tieren im Mittel ein Vorliegen von Stadium 31. Dieses ist gekennzeichnet durch das Auftreten eines „paddelförmigen Fußes“ am Ende der Hintergliedmaße. Das Verhältnis Länge/Durchmesser der Hintergliedmaßen lag etwa bei 2.

Auch bei der zweiten Probennahme ergab die Bestimmung des Körpergewichts eine erhebliche Streuung der Werte. Während die Kontrolle ein mittleres Körpergewicht von 218,5 mg \pm 82,4 aufwies, lag diese bei der Gruppe, die dem Abwasser in einer Verdünnung von 12:1 ausgesetzt war bei 228,7 mg \pm 63,6. Bei Tieren aus der 2:1 Abwasserverdünnung kam es zu einer hoch signifikanten Erhöhung des Gewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe, welches 252,8 mg \pm 77,5 betrug.

Tab. 13 Entwicklungsdaten vom 11.05.00

Replikat	Stadium [Gosner]		Gewicht [mg]	
	Mittelwert (n=30)	Standardabw.	Mittelwert (n=30)	Standardabw.
K _A	33,17	1,8	281,9	91,9
K _B	30,8	1,5	187,7	59,8
K _C	32,13	1,85	185,9	52,8
K-ges	32,03	1,95	218,5	82,4
12:1 _A	31,97	1,75	239,8	63,2
12:1 _B	31,7	1,15	235,9	55,5
12:1 _C	31,6	3,1	210,5	70,4
12:1-ges.	31,73	1,62	228,7	63,6
2:1 _A	31,3	1,9	241,6	79,9
2:1 _B	32,2	1,57	282,5	79,6
2:1 _C	31,7	2,3	234,3	67,4
2:1-ges.	31,74	1,95	252,8***	77,5

*** p<0,001

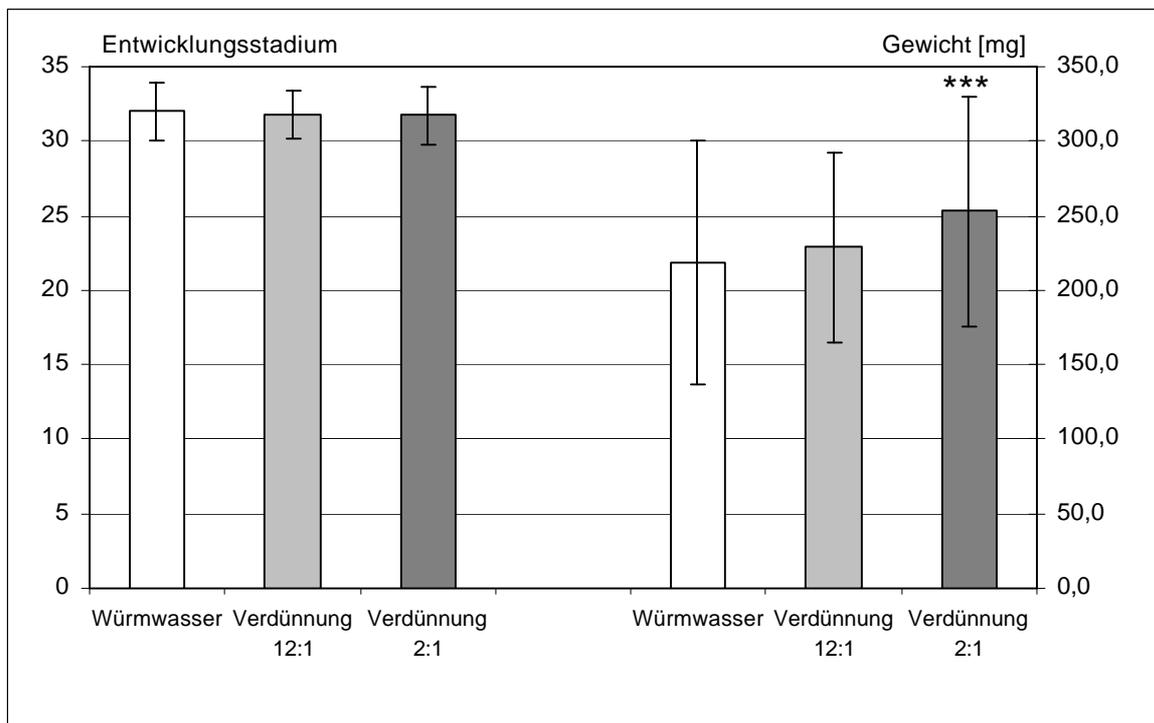


Abb. 10 Entwicklungsstadien nach Gosner (1960) und Körpergewicht von *Rana temporaria* am 11.05.00; *** p<0,001

4.2.2. *Xenopus laevis* (Gruppe Ib)

Die Ergebnisse aus der Bestimmung der Entwicklungsstadien bei *Xenopus laevis* finden sich in Tab. 14 und sind in Abb. 11 grafisch dargestellt. Pro Replikat wurde bei jeweils 100 Tieren, das heißt bei 300 Individuen pro Ansatz, das Entwicklungsstadium anhand des Bestimmungsschlüssel von Nieuwkoop und Faber (1975) ermittelt.

Tab. 14 Entwicklungsstadien nach Nieuwkoop und Faber (1975) vom 11.04.00 und 15.05.00

Datum	Gruppe	n	Entwicklungsstadium [Nieuwkoop und Faber]	
			Mittelwert	Stabw.
11.04.00	Kontrolle	300	47,52	1,77
	12:1	300	47,26	0,87
	2:1	300	47,75	1,06
15.05.00	Kontrolle	300	49,75	3,38
	12:1	300	50,80	3,81
	2:1	300	50,28	3,69

Die erste Untersuchung zur Larvalentwicklung erfolgte am 11.04.00. Bei den Kontrolltieren und den Tieren, die in den beiden Abwasserverdünnungen gehalten wurden, lag im Mittel das Stadium 48 (Nieuwkoop und Faber, 1975) vor. Dieses Stadium ist durch eine Gesamtkörperlänge der Kaulquappe von ca. 15 mm gekennzeichnet.

Die zweite Untersuchung zur Larvalentwicklung wurde am 15.05.00 durchgeführt. Bei allen Kontroll- und Versuchsgruppen lag im Mittel das Stadium 50 (Nieuwkoop und Faber, 1975) vor. Bei diesem Stadium waren die sich entwickelnden Hintergliedmaßen als ca. 1 mm großer Stummel zu erkennen und die Gesamtkörperlänge der Kaulquappen betrug ca. 19 mm.

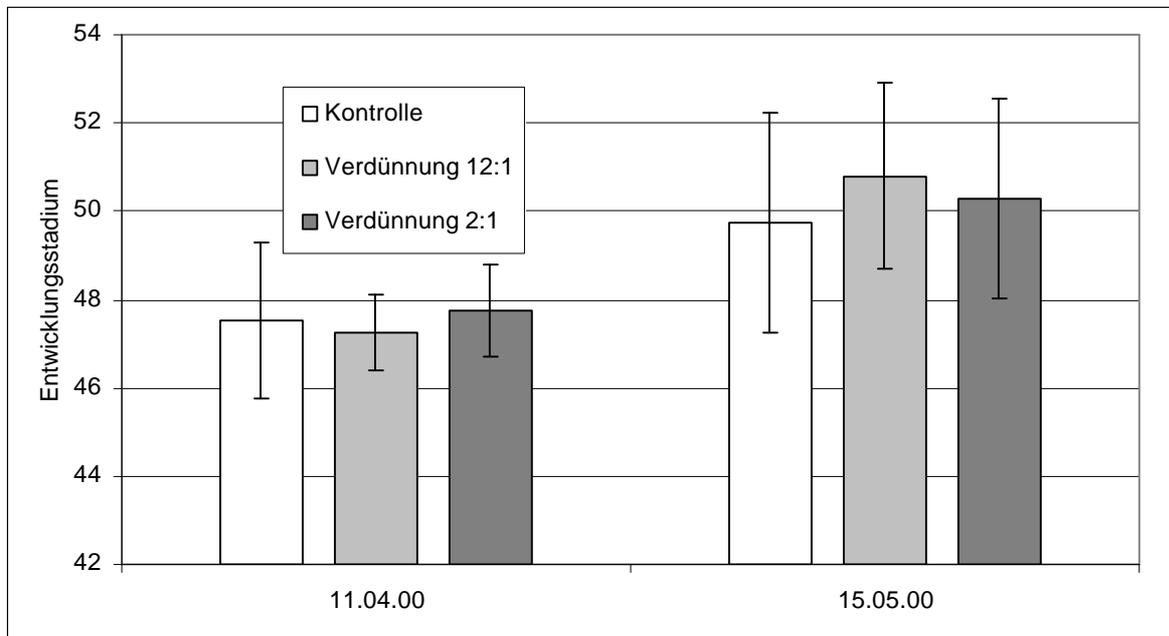


Abb. 11 Entwicklungsstadien nach Nieuwkoop und Faber (1975) am 11.04.00 und 15.05.00

4.3. Lichtmikroskopie von Gonadengewebe

Bei allen Gruppen wurde eine lichtmikroskopische Untersuchung des Gonadengewebes vorgenommen. Aufgrund des histologischen Erscheinungsbildes wurde das Geschlecht ermittelt und anhand der in Tab. 15 aufgelisteten morphologischer Kriterien der gonadale Reifegrad bestimmt.

Tab. 15 *Histologische Kriterien zur Bestimmung des gonadalen Reifegrades*

Reifegrad	Morphologische Kriterien
<u>männlich</u>	
I	Spermatogonien
II	Keimzellen befinden sich in Spermatozyten (Keimzysten) Spermatogonien, Spermatozyten
III	Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatozoen
<u>weiblich</u>	
I	Oogonien, Oozyten in der Frühphase
II	Oogonien, Oozyten in der previtellogenen Phase (Dotterkern wird im Cytoplasma sichtbar)
III	Oogonien, Oozyten in der vitellogenen Phase (Akkumulation von Dotter in der Eizelle)

Bei *Rana temporaria* ist das Auftreten von geschlechtlich undifferenzierten Rassen beschrieben, bei welchen genotypisch männliche Tiere zunächst Ovarien ausbilden. In einem Transformationsprozess wandeln sich die Ovarien in Hoden um. Während dieses Prozesses haben die Gonaden einen intersexuellen Charakter. Bei den Grasfroschgruppen, bei denen Hermaphroditen auftraten (Gruppe I, IIa), erfolgte eine Einteilung der verschiedenen Transformationsstadien anhand der in Tab. 16 beschriebenen morphologischen Kriterien.

Tab. 16 *Morphologische Kriterien zur Einteilung der Transformationsstadien*

Transformationsstadien	morphologische Kriterien
I	beginnende Einwanderung von Medullargewebe
II	Weibliches Gonadengewebe ist noch vorherrschend: Medullargewebe breitet sich weiter aus, vereinzelt Oozytendegeneration, Spermatogonien sind in einzelnen Bereichen zu erkennen
III	Männliches Gonadengewebe vorherrschend: Oozyten befinden sich (fast) alle in Degeneration Spermatogonien sind im ganzen Organ verteilt zu finden

4.3.1. Gruppe I (Expositionsversuch)

Bei insgesamt 740 Grasfröschen und 307 Krallenfröschen des Expositionsversuches wurde eine lichtmikroskopische Untersuchung von Gonadengewebe vorgenommen.

4.3.1.1. Gruppe Ia: *Rana temporaria* – histologisches Erscheinungsbild

Ovarien

Die Ovarien der Grasfrösche waren von einer Epithelschicht umgeben. Das Organ erwies sich im Gegensatz zum Hoden nicht als kompakt, sondern bildete eine Ovarialhöhle. Diese war jedoch in den histologischen Schnitten nicht immer deutlich zu beobachten. Das Organ war mit Oogonien und Oozyten ausgefüllt (Abb. 12). Die Oozyten befanden sich in der Frühphase der Oogenese (Abb. 13). Sie besaßen einen großen runden Kern mit zahlreichen peripher liegenden Nukleoli, die sich basophil färbten und wurden von Follikelzellen umgeben. Die Follikelzellschicht erwies sich in diesem Stadium als einschichtig. Zwischen den einzelnen Follikelzellen waren keine interzellulären Zwischenräume zu erkennen. Die Follikelzellen erschienen deutlich abgeflacht und besaßen nur einen schmalen Zytoplasmasaum. Die Oogonien waren in den Randbereichen lokalisiert (Abb. 12). Sie wurden nicht wie die Oozyten einzeln von Follikelzellen umgeben, sondern bildeten sogenannte Keimzellnester, in denen mehrere Oogonien von einer Follikelzellschicht umschlossen wurden. Bindegewebiges Stroma wurde bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der weiblichen Gonaden nur in sehr geringen Mengen gefunden.

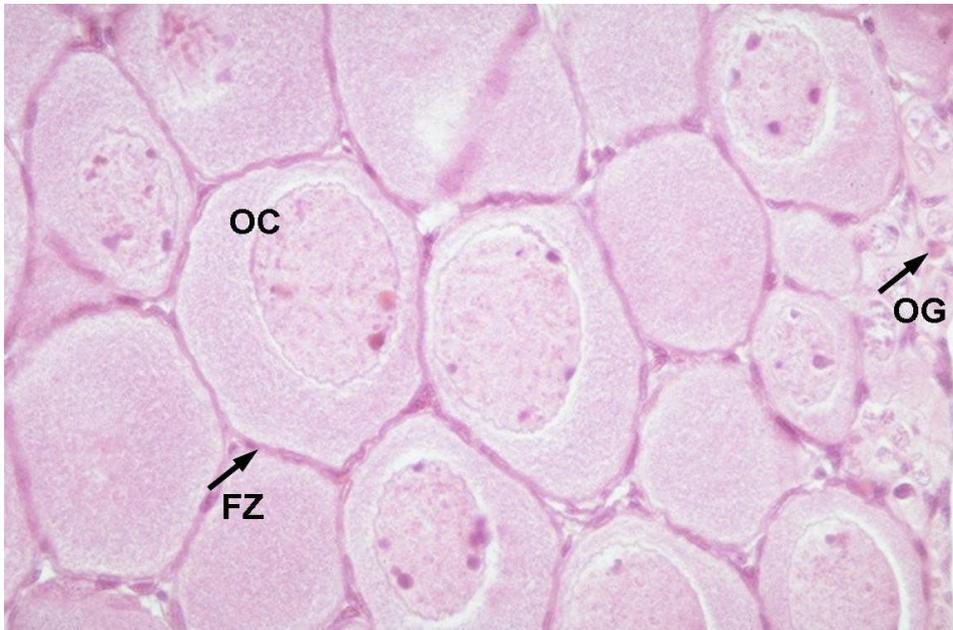


Abb. 12 *Rana temporaria* (juvenil), Ovarialgewebe
Oozyten (OC), Follikelzellschicht (FZ), Oogonien (OG)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

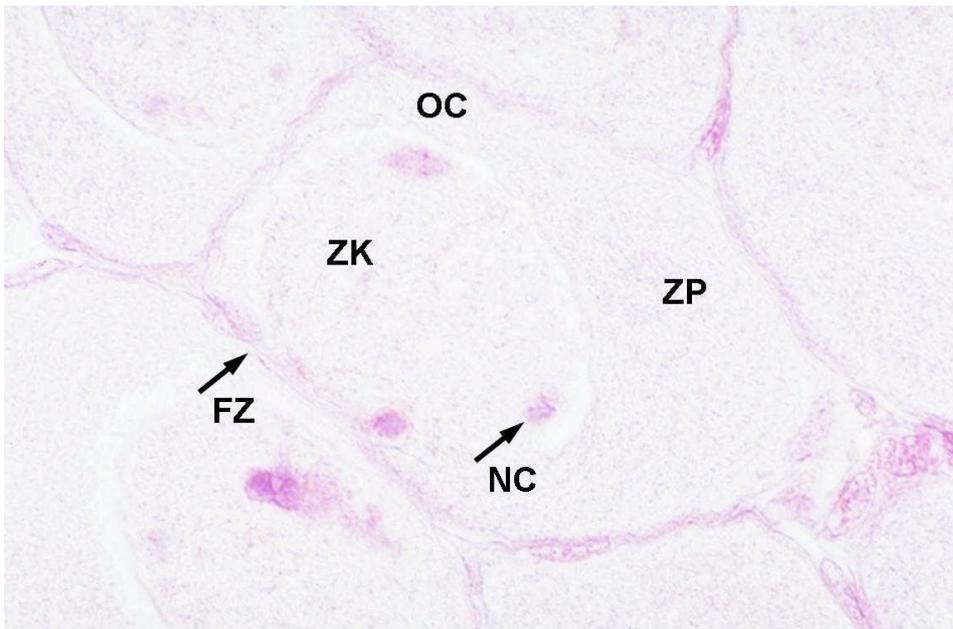


Abb. 13 *Rana temporaria* (juvenil), Ovarialgewebe
Oozyten (OC), Zellkern (ZK), Nukleolus (NC), Zytoplasma (ZP), Follikel-
zellschicht (FZ)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 1000x

Hoden

Die Hoden der Grasfrösche stellten sich bei der lichtmikroskopischen Untersuchung als kleines kompaktes Organ dar, das zum Teil bereits eine tubuläre Struktur erkennen ließ. Im gesamten Organ verteilt, fanden sich Spermatogonien, die in Gruppen zusammenlagen und von somatischen Zellen umgeben waren (Abb. 14). Weitere Stadien der Spermiogenese oder Keimzysten waren zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht entwickelt. Es wurden zwei verschiedene Typen von Spermatogonien gefunden (Abb. 14, Abb. 15). Die Spermatogonien vom Typ I wiesen einen großen Zellkern und einen schmalen Zytoplasmasaum auf, die Spermatogonien vom Typ II waren etwas kleiner als der Typ I und zeigten Nukleoli in peripherer Lage. Neben den Keimzellen fand sich im Hodengewebe eine große Anzahl somatischer Zellen (Abb. 15). Die somatischen Zellen wiesen eine eher spindelförmige Gestalt auf und einen im Vergleich zu den Keimzellen deutlich kleineren, abgeflachten Zellkern. Die somatischen Zellen lagen in Gruppen zusammen oder befanden sich einzeln zwischen den Keimzellen. Bindegewebiges Stroma war im Hoden zu diesem Zeitpunkt stärker ausgebildet als in den Ovarien.

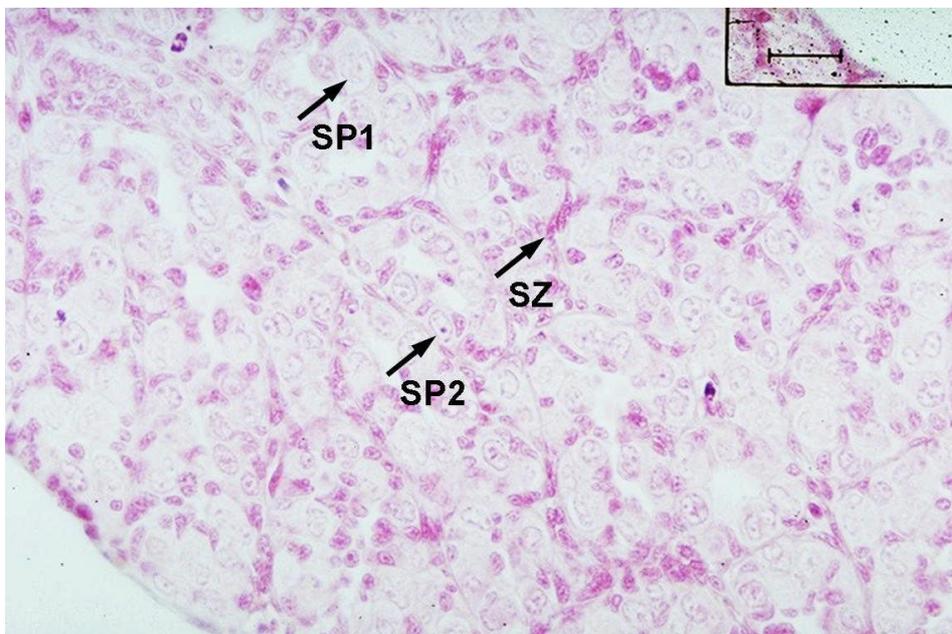


Abb. 14 *Rana temporaria* (juvenil), Hodengewebe

Spermatogonien-Typ I (SP1), Spermatogonien-Typ II (SP2), somatische Zellen (SZ)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

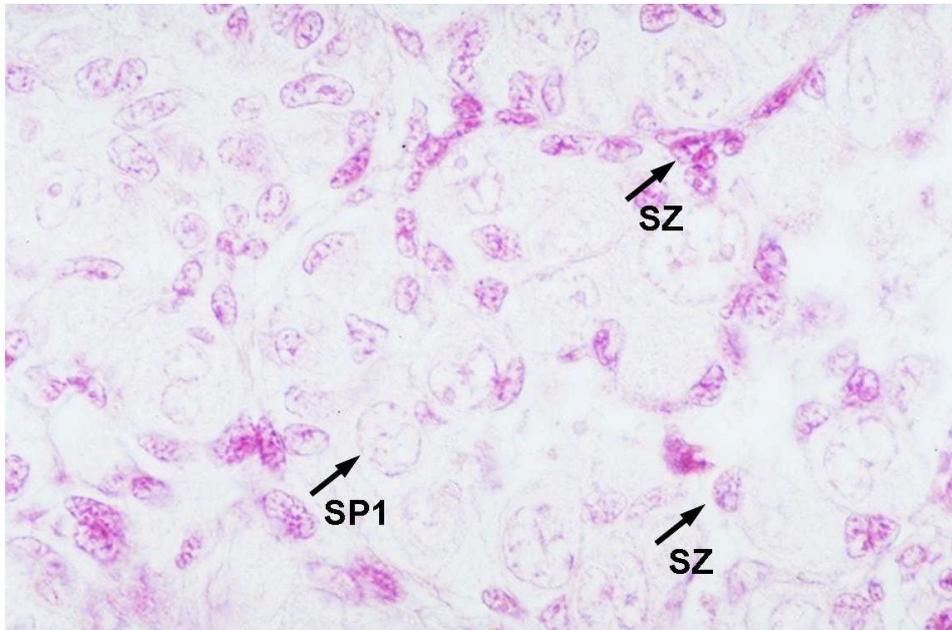


Abb. 15 *Rana temporaria* (juvenil), Hodengewebe
Spermatogonien-Typ I (SP1), somatische Zellen (SZ)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 1000x

Hermaphroditen, Transformationsstadien

Bei den im Versuch eingesetzten aus einer Mittellandpopulation (Versuchsanlage Wielenbach) stammenden Grasfröschen fanden sich neben rein männlichem oder rein weiblichem Gonadengewebe auch Übergangsstadien, sogenannte Hermaphroditen. Die Untersuchung dieser Tiere ergab das Vorliegen von Umwandlungsprozessen von weiblichem in männliches Gonadengewebe, welche unterschiedlich weit fortgeschritten waren. Anhand morphologischer Kriterien wurden diese Transformationsprozesse in drei verschiedene Stadien (Tab. 16) eingeteilt.

Der Transformationsprozess begann mit einer vom Hilus ausgehenden Einwanderung von Medullargewebe in das Ovar (Stadium I, Abb. 16). Nur einige Gonaden zeigten bereits in diesem Stadium eine Oozytendegeneration. Im weiteren Verlauf waren Degenerationerscheinungen insbesondere in den Bereichen zu beobachten, die von dem einwandernden Medullargewebe bereits infiltriert worden waren oder an das eingewanderte Medullargewebe angrenzten. Vereinzelt waren degenerierende Oozyten auch in bis dahin unverändertem Ovarialgewebe zu beobachten (Stadium II, Abb. 17). In einigen Fällen befanden sich bereits alle Oozyten in Degeneration und der gesamte Bereich war von Medullargewebe infiltriert. Kurz vor Abschluss des Umwandlungsprozesses waren nur noch einzelne Oozyten im Gonadengewebe nachweisbar, welches nun die für Hodengewebe typischen Strukturmerkmale

aufwies (Stadium III, Abb. 18, Abb. 19). Neben zahlreichen somatischen Zellen fanden sich auch Spermato gonien.

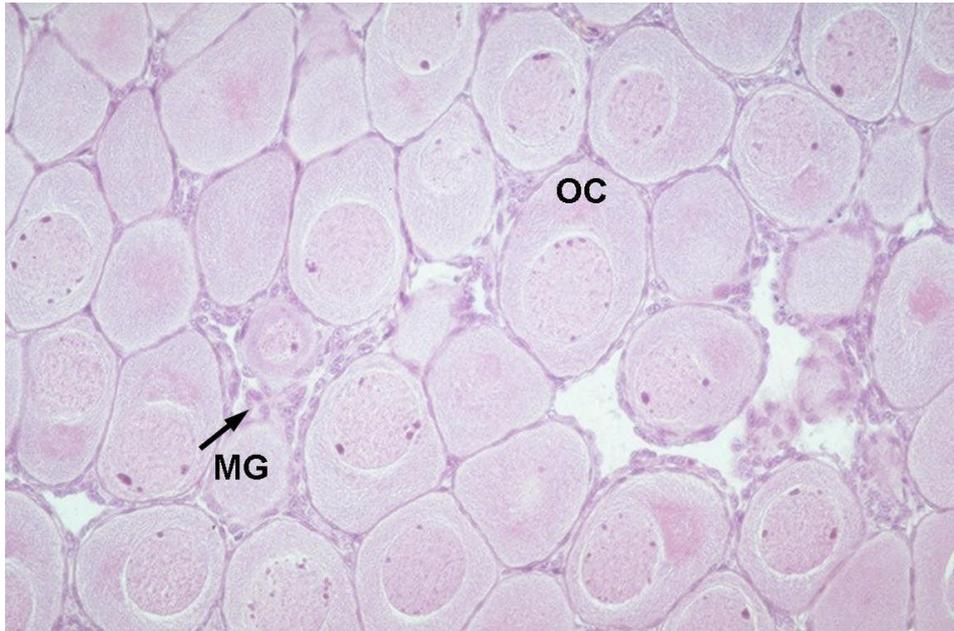


Abb. 16 *Rana temporaria* (juvenil), Hermaphrodit: Transformationsstadium I, beginnende Einwanderung von Medullargewebe (MG), die Oozyten (OC) sind unverändert
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

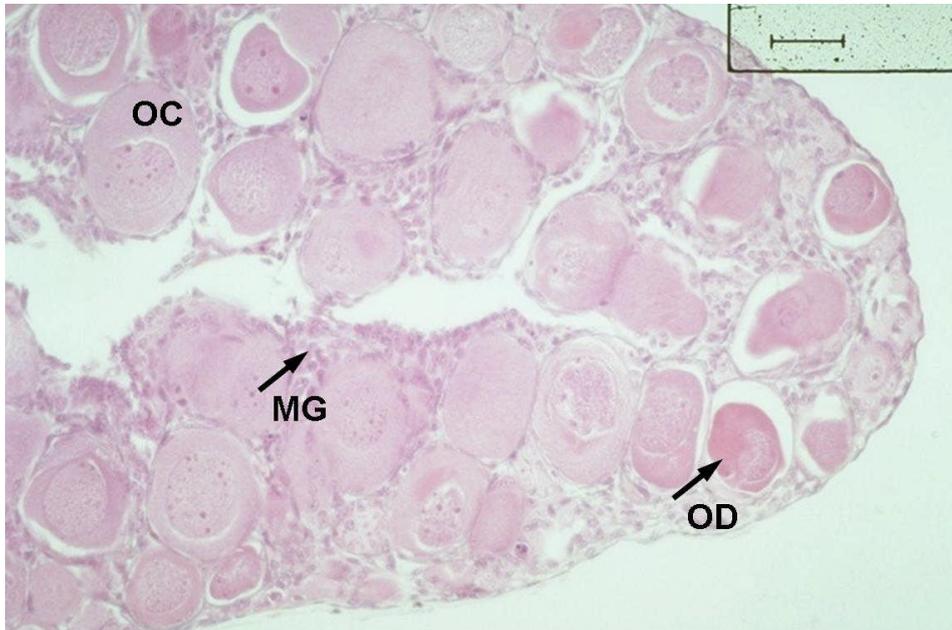


Abb. 17 *Rana temporaria* (juvenil), Hermaphrodit: Transformationsstadium II, Medullargewebe (MG) hat das gesamte Organ infiltriert, Oozytendegeneration (OD), unveränderte Oozyte (OC)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 200x

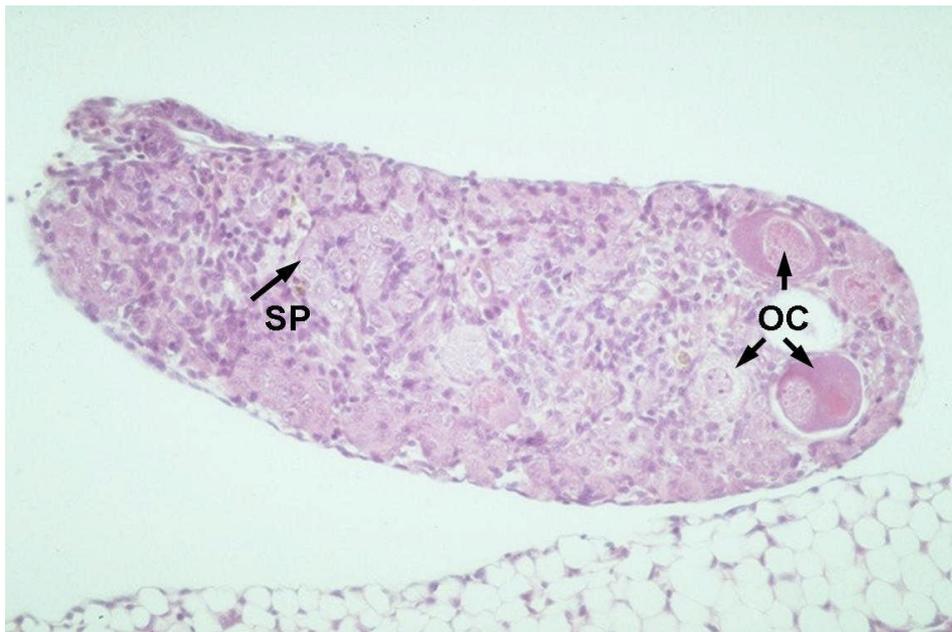


Abb. 18 *Rana temporaria* (juvenil), Hermaphrodit: Transformationsstadium III, Hodengewebe dominiert, Spermatogonien (SP) sind zu finden, die Oozyten (OC) zeigen Degenerationserscheinungen
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 100x

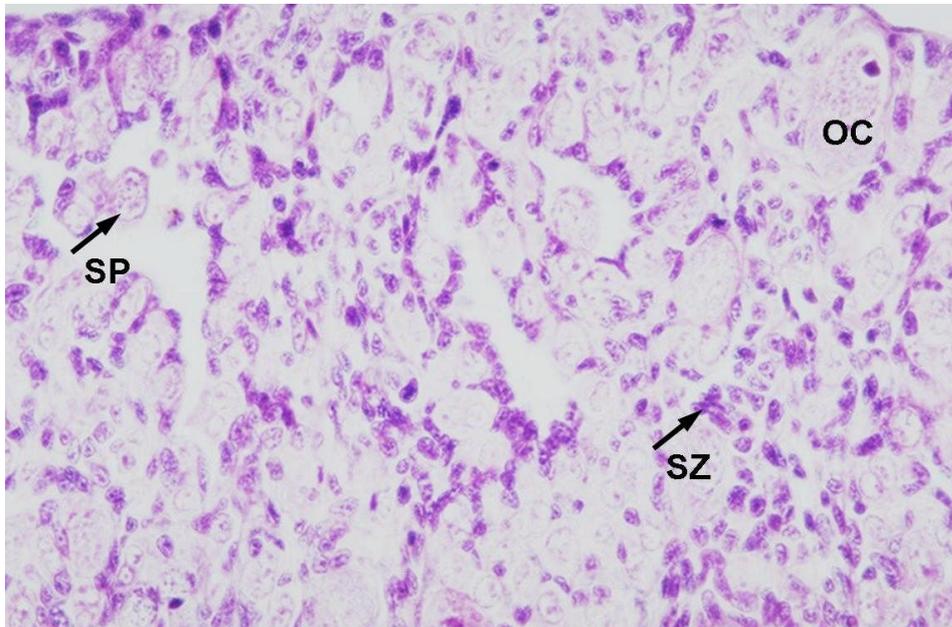


Abb. 19 *Rana temporaria* (juvenil), Hermaphrodit: Transformationsstadium III, einzelne Oozyten (OC) zwischen somatischen Zellen (SZ), Spermatogonien (SP)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 1000x

Der Transformationsprozess fand bei der Mehrzahl der untersuchten Hermaphroditen zeitgleich bilateral, das heißt an beiden Gonadenhälften gleichzeitig statt. Bei einigen Tieren konnte jedoch ein lateraler Hermaphroditismus (Abb. 20) beobachtet werden. In diesen Fällen wies eine Gonadenseite noch die typischen Merkmale eines Ovars ohne jegliche Transformationsprozesse auf, während die andere Gonadenseite bereits einen intersexuellen Charakter erkennen ließ. Im Extremfall war der Transformationsprozess bei einer Gonade bereits abgeschlossen, so dass sowohl ein Ovar als auch ein Hoden vorhanden war.

Die Umwandlung der Ovarien in Hoden begann immer an einem Pol der Gonade mit der Einwanderung von Medullargewebe und schritt dann in der Regel im gesamten Organ gleichmäßig voran. Bei einigen Gonaden waren hingegen alle Stadien des Transformationsprozesses gleichzeitig zu beobachten (Abb. 21). Die Stadienbestimmung richtete sich bei diesen Tieren nach dem im Transformationsprozess am weitesten fortgeschrittenen Bereich.

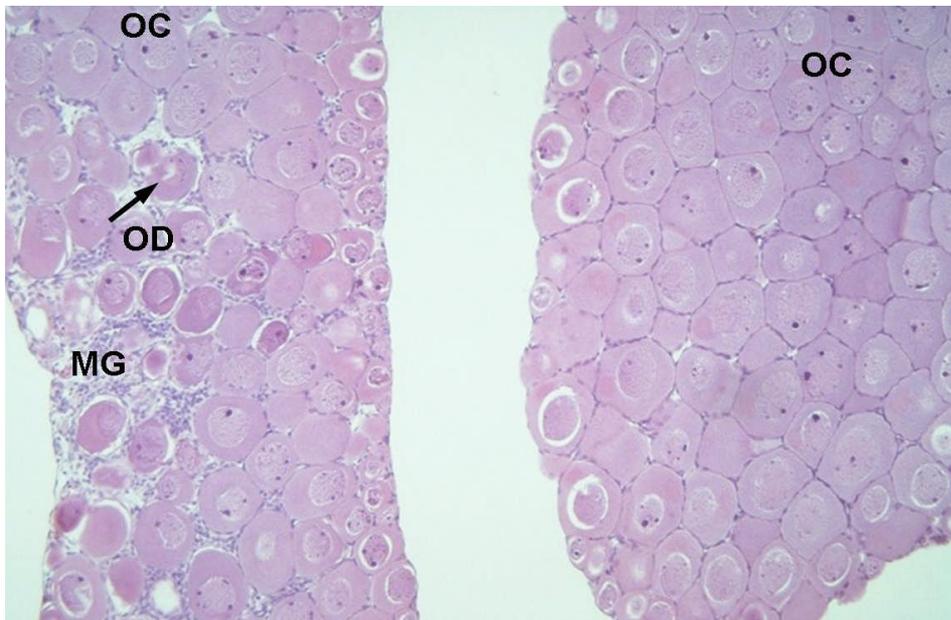


Abb. 20 *Rana temporaria* (juvenil), lateraler Hermaphroditismus
Oozyten (OC), Oozytendegeneration (OD), eingewandertes Medullar-
gewebe (MG)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 100x

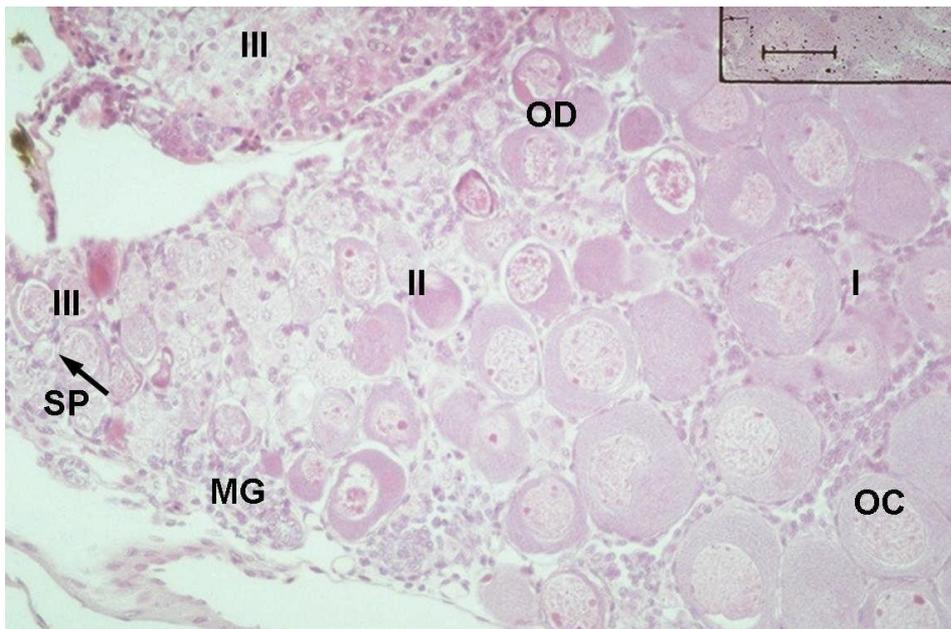


Abb. 21 *Rana temporaria* (juvenil), Hermaphrodit: Transformations-
stadien I,II und III, einwanderndes Medullargewebe (MG), Oozyten (OC),
Oozytendegeneration (OD), Spermatogonien (SP)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 100x

Pathologische Befunde

Einige der untersuchten weiblichen Gonaden wiesen eine mittel- bis hochgradige Oozyten-degeneration mit Formverlust und Karyolyse auf. Bei der Mehrzahl der Ovarien mit Degenerationserscheinungen war keine zelluläre Reaktion zu erkennen (Abb. 22). Einige Ovarien ließen deutliche Resorptionsvorgänge durch eingedrungene Makrophagen erkennen (Abb. 23).

Bei einem Teil der weiblichen Tiere wurden lymphozytäre Infiltrate beobachtet, welche oft herdförmig angeordnet und unterschiedlich stark ausgeprägt waren (Abb. 24).

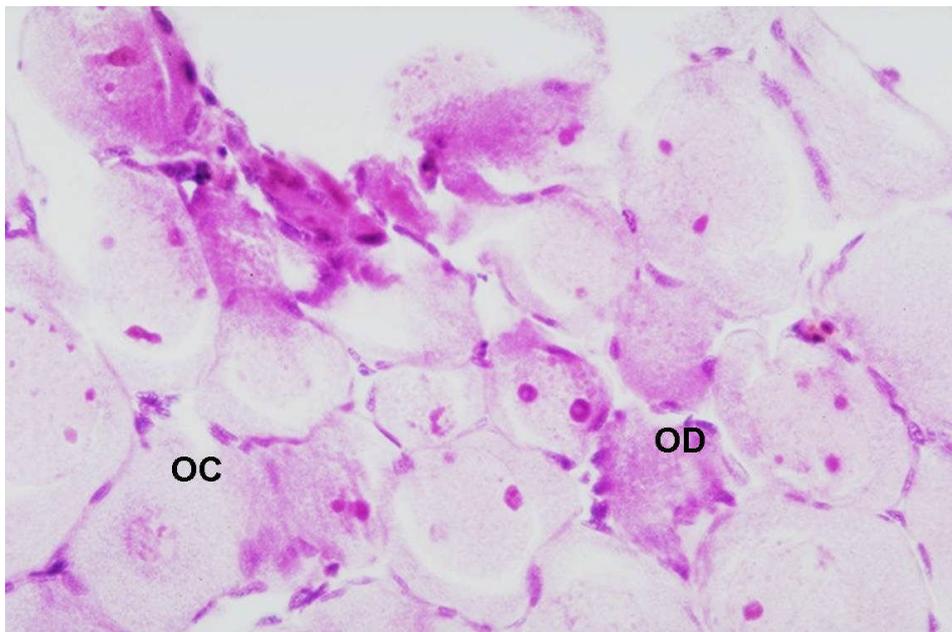


Abb. 22 *Rana temporaria* (juvenil), Ovarialgewebe: Oozyten-degeneration (OD), Oozyten (OC)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

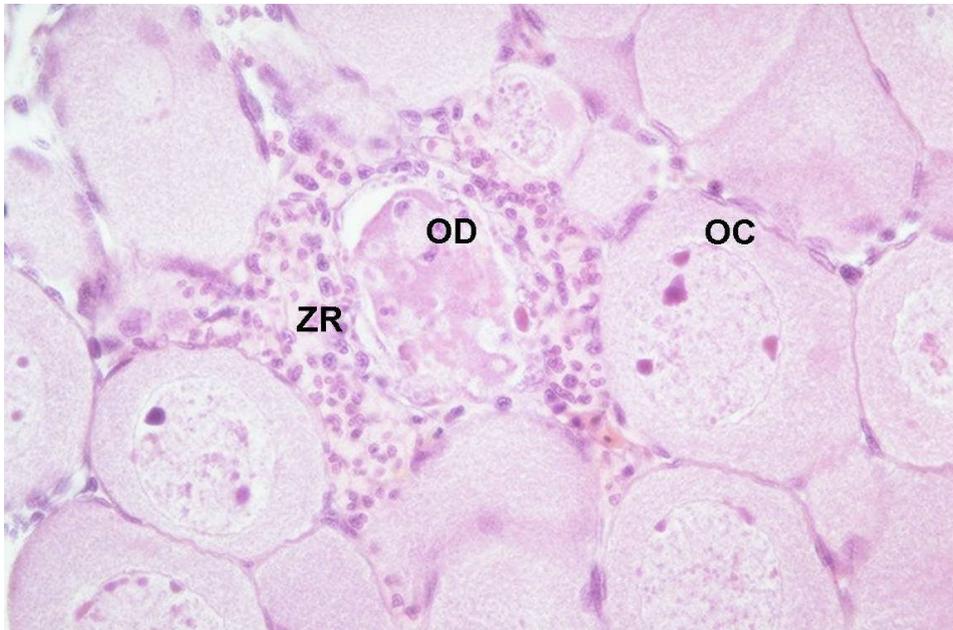


Abb. 23 *Rana temporaria* (juvenil), Ovarialgewebe: Oozyten-
degeneration (OD) mit zellulärer Reaktion (ZR), Oozyten (OC)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

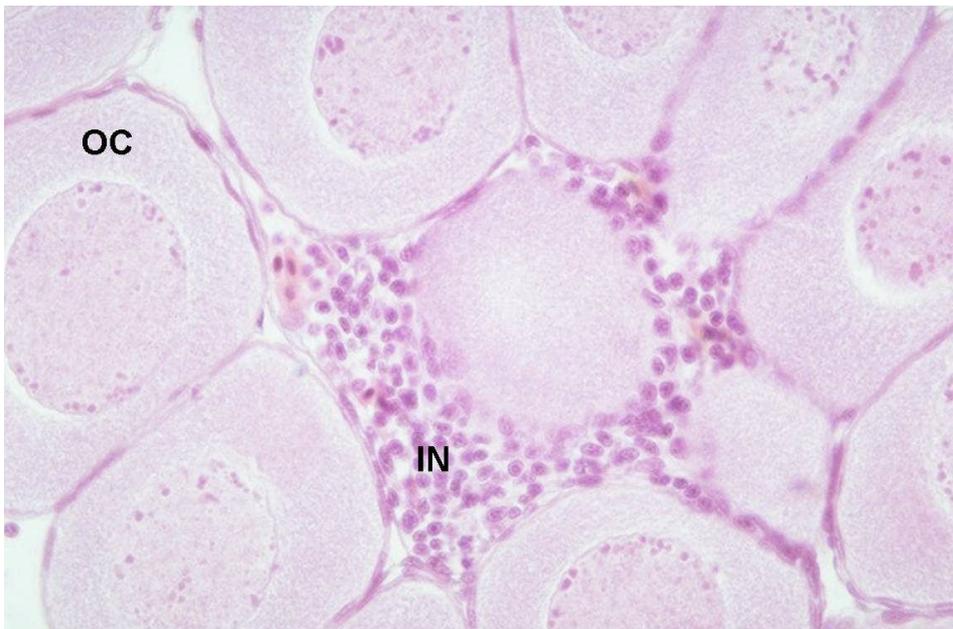


Abb. 24 *Rana temporaria* (juvenil), Ovarialgewebe: lymphozytäres
Infiltrat (IN), Oozyten (OC)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

4.3.1.2. Gruppe Ia: *Rana temporaria* – gonadaler Reifegrad, Geschlechterverhältnis und Transformationsprozesse

Die Bestimmung des gonadalen Reifegrades ergab die in Tab. 17 aufgeführten Ergebnisse. Die männlichen Gonaden sowohl der Kontrollgruppe als auch der Versuchsgruppen wiesen generell einen Reifegrad I auf. Es fanden sich ausschließlich Spermatogonien und somatische Zellen, Keimzysten waren noch nicht ausgebildet. Somit wies der gonadale Reifegrad bei den männlichen Tieren keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen auf. Auch bei den weiblichen Gonaden zeigten alle Gruppen übereinstimmend einen Reifegrad I. Alle Oozyten befanden sich im Frühstadium der Entwicklung.

Tab. 17 Bestimmung des gonadalen Reifegrades bei *Rana temporaria* (Gruppe Ia, Expositionsversuch) nach Exposition in verschiedenen Abwasserverdünnungen und Würmwasser (Kontrolle)

Replikat	n	Reifestadium (m)			Reifestadium (w)			HA		
		m	I	II	III	w	I		II	III
K _A	95	26	26	0	0	48	48	0	0	21
K _B	77	15	15	0	0	41	41	0	0	21
K _C	56	0	0	0	0	35	35	0	0	21
K-ges.	172	41	41	0	0	124	124	0	0	63
			100%	0,0%	0,0%		100%	0,0%	0,0%	
12:1 _A	90	26	26	0	0	50	50	0	0	14
12:1 _B	88	4	4	0	0	44	44	0	0	40
12:1 _C	76	6	6	0	0	40	40	0	0	30
12:1-ges.	254	36	36	0	0	134	134	0	0	84
			100%	0,0%	0,0%		100%	0,0%	0,0%	
2:1 _A	96	19	19	0	0	39	39	0	0	38
2:1 _B	81	21	21	0	0	39	39	0	0	21
2:1 _C	81	28	28	0	0	32	32	0	0	21
2:1-ges.	258	68	68	0	0	110	110	0	0	80
			100%	0,0%	0,0%		100%	0,0%	0,0%	

n: Gesamtzahl der untersuchten Tiere; m: männlich; w: weiblich; Reifestadium (m)/(w): gonadaler Reifegrad der männlichen/weiblichen Tiere; I,II,III: Stadium der Gonadenreifung; HA: Hermaphrodit

Die Geschlechterverhältnisse sowie die Transformationsstadien der Hermaphroditen sind in Tab. 18 aufgeführt und in Abb. 25, Abb. 26 grafisch dargestellt. Die Prozentanteile der Transformationsstadien beziehen sich auf die Gesamtzahl der Hermaphroditen.

Signifikante Unterschiede bezüglich des Geschlechterverhältnisses zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe wurden nicht festgestellt. Tendenziell war der Weibchenan-

teil in der Kontrollgruppe am höchsten (54,4%), gefolgt von der 12:1-Versuchsgruppe (52,8%) und den Tieren, die dem Abwasser in einer Verdünnung von 2:1 ausgesetzt waren (42,6%). Der Anteil der männlichen Tieren betrug bei der Kontrollgruppe 18%, bei der 12:1-Versuchsgruppe 14,2% und bei der 2:1-Versuchsgruppe 26,4%.

Tab. 18 Geschlechterverteilung und Transformationsstadien bei *Rana temporaria* der Gruppe Ia (Expositionsversuch) nach Exposition in verschiedenen Abwasserverdünnungen bzw. in Würmwasser (Kontrolle)

Replikant	Alter (Monate)	n	m (%)	w (%)	HA (%)	Transformationsstadien		
						I (%)	II (%)	III (%)
K _A	4	95	26 (27%)	48 (51%)	21 (22%)	2 (10%)	5 (24%)	14 (67%)
K _B	4	77	15 (19%)	41 (53%)	21 (27%)	2 (10%)	4 (19%)	15 (71%)
K _C	4	56	0 (0%)	35 (63%)	21 (38%)	1 (5%)	4 (19%)	16 (76%)
K-ges.	4	172	41 (18%)	124 (54,4%)	63 (27,6%)	5 (7,9%)	13 (20,6%)	45 (71,4%)
12:1 _A	4	90	26 (29%)	50 (56%)	14 (16%)	5 (36%)	1 (7%)	8 (57%)
12:1 _B	4	88	4 (5%)	44 (50%)	40 (45%)	9 (23%)	17 (43%)	14 (35%)
12:1 _C	4	76	6 (8%)	40 (53%)	30 (39%)	8 (27%)	7 (23%)	15 (50%)
12:1-ges.	4	254	36 (14,2%)	134 (52,8%)	84 (33,1%)	22 (26,2%)***	25 (29,8%)*	37 (44%)**
2:1 _A	4	96	19 (20%)	39 (41%)	38 (40%)	12 (32%)	10 (26%)	16 (42%)
2:1 _B	4	81	21 (26%)	39 (48%)	21 (26%)	7 (33%)	2 (10%)	12 (57%)
2:1 _C	4	81	28 (35%)	32 (40%)	21 (26%)	9 (43%)	3 (14%)	9 (43%)
2:1-ges.	4	258	68 (26,4%)	110 (42,6%)	80 (31%)	28 (35%)***	15 (18,8%)	37 (46,3%)**

n: Anzahl der Tiere; m: männlich; w: weiblich; HA: Hermaphroditen; HA I, HA II, HA III: Hermaphroditen im Transformationsstadium I, II und III; ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,1 (Chi-Quadrat-Test)

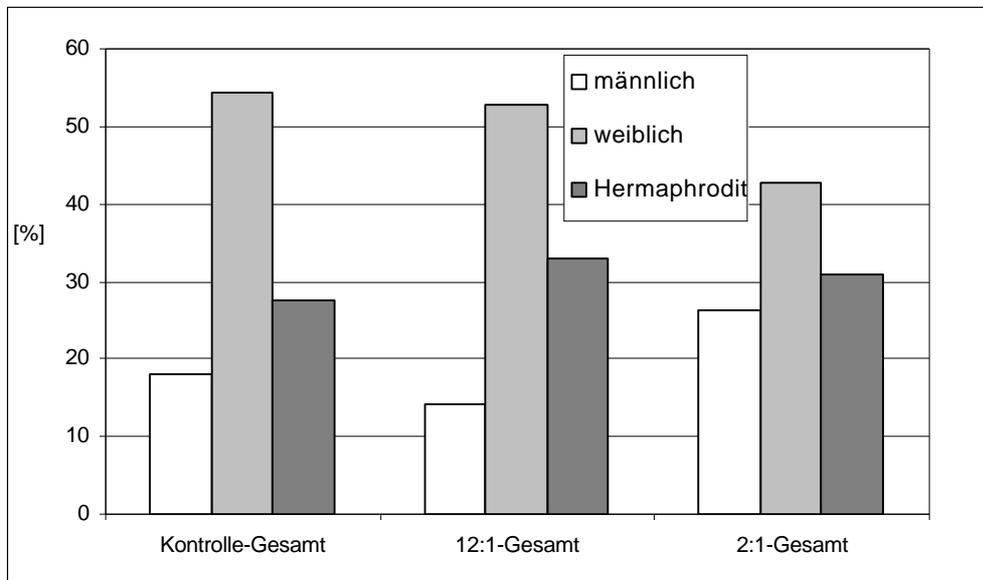


Abb. 25 Geschlechterverhältnis von *Rana temporaria* (Gruppe Ia, Expositionsversuch) nach Exposition in verschiedenen Abwasserverdünnungen und Würmwasser (Kontrolle)

Der Anteil der Hermaphroditen wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe auf. Bei der Kontrollgruppe war ein Hermaphroditenanteil von 27,6% zu verzeichnen, bei der 12:1-Versuchsgruppe lag dieser bei 33,1% und bei der 2:1-Versuchsgruppe bei 31%. Hinsichtlich der prozentualen Anteile der einzelnen Transformationsstadien zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Sowohl bei der 12:1 Versuchsgruppe (26,2%) als auch bei der 2:1-Versuchsgruppe (35%) war der Anteil von Tieren im Transformationsstadium I signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (7,9%). Gleichzeitig wurde eine signifikante Abnahme des Transformationsstadiums III bei den Versuchsgruppen (12:1: 44%, 2:1: 46,3%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (71,4%) festgestellt. Ein schwach signifikanter Anstieg des Transformationsstadiums II im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei der 12:1-Versuchsgruppe festgestellt werden. Dieser wies einen Anteil von 29,8% im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 20,6% auf.

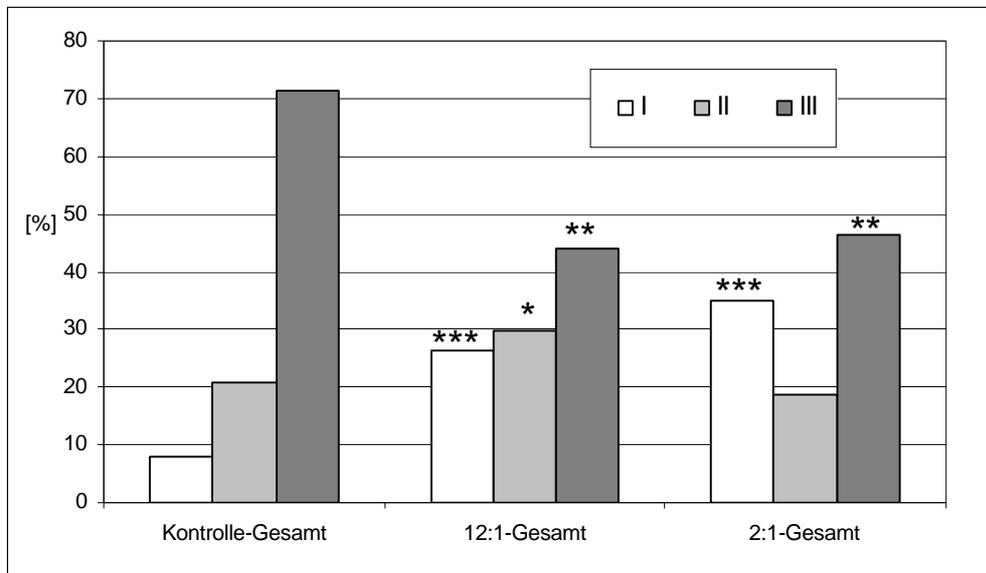


Abb. 26 Verteilung der Transformationsstadien bei den Hermaphroditen von *Rana temporaria* (Gruppe Ia, Expositionsversuch) nach Exposition in verschiedenen Abwasserverdünnungen; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,1$

4.3.1.3. Gruppe Ib: *Xenopus laevis* – histologisches Erscheinungsbild

Ovarien

Die Ovarien der Krallenfrösche zeigten sich ebenfalls von einem Epithel umgeben und wiesen eine girlandenförmige Struktur auf. Die Ovarialhöhle war im lichtmikroskopischen Bild oft nicht deutlich zu erkennen. Die Ovarien der weiblichen Tiere wiesen übereinstimmend Reifegrad I auf (Tab. 15). Neben den Oogonien waren Oozyten in der Frühphase zu erkennen (Abb. 27, Abb. 28). Die Oozyten der Krallenfrösche ließen einen großen runden Kern mit peripher liegenden Nukleoli erkennen und waren von einer einschichtigen Follikelzellschicht umgeben. Die flachen Zellen lagen den Oozyten dicht an und ließen keine interzellulären Zwischenräume entstehen. Die deutlich kleineren Oogonien waren nicht von Follikelzellen umgeben und eher im peripheren Bereich der Kortex lokalisiert (Abb. 27, Abb. 28).

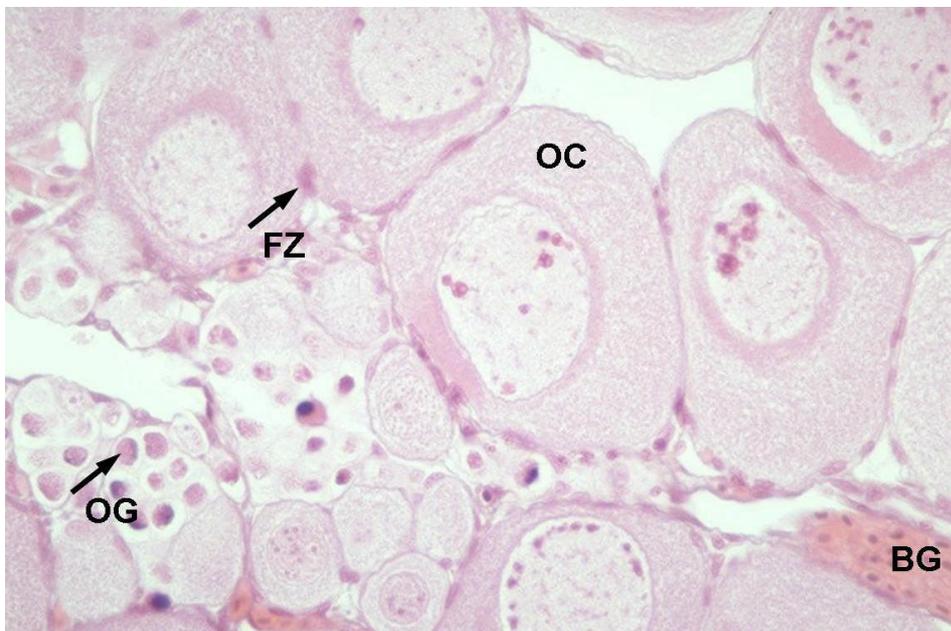


Abb. 27 *Xenopus laevis*, Ovarialgewebe: gonadaler Reifegrad I
Oogonien (OG), Oozyten (OC) mit Follikelzellschicht (FZ), Blutgefäß (BG)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

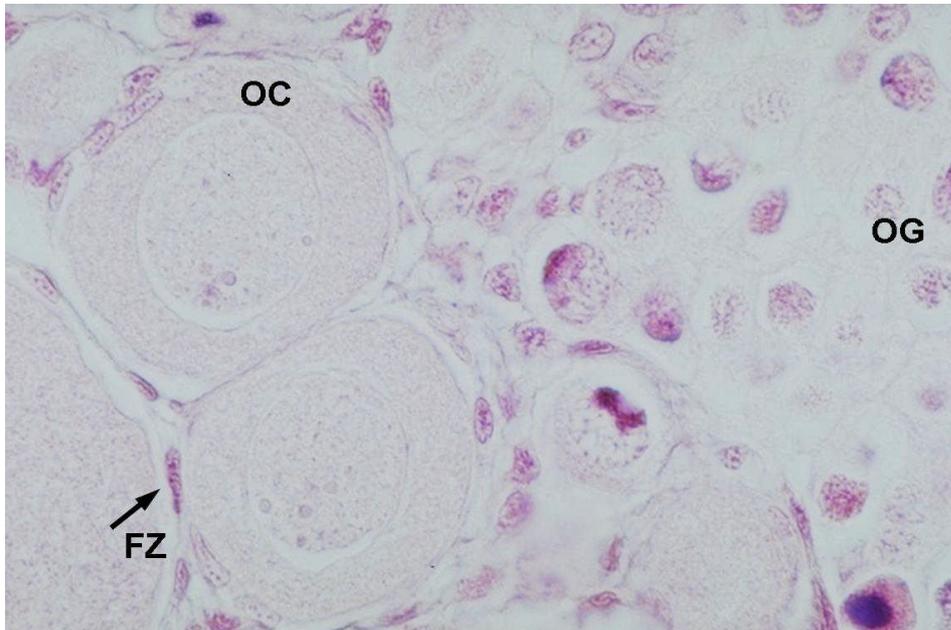


Abb. 28 *Xenopus laevis*, Ovarialgewebe: gonadaler Reifegrad I
Oozyten (OC), Oogonien (OG), Follikelzellschicht (FZ)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 1000x

Hoden

Der Hoden der Krallenfrösche stellte im Vergleich zu den Ovarien ein kleines kompaktes, annähernd ellipsenförmiges Organ dar. Bei den untersuchten Krallenfröschen waren zu diesem Zeitpunkt bereits alle drei gonadalen Reifegrade (siehe Tab. 15) zu finden. Bei Hoden vom Reifegrad I (Abb. 29) war die typisch tubuläre Struktur noch nicht deutlich ausgeprägt und es fanden sich ausschließlich Spermatogonien und somatische Zellen. Bei den Spermatogonien ließen sich zwei verschiedene Typen unterscheiden. Die Typ I-Spermatogonien waren relativ groß, wiesen einen unregelmäßig geformten hellen Kern auf und hatten einen schmalen Zytoplasmasaum. Die Typ II-Spermatogonien waren etwas kleiner als der Typ I, zeigten jedoch einen etwas breiteren Zytoplasmasaum. Der Kern war ebenfalls unregelmäßig geformt und ließ zum Teil einen basophilen Nukleolus in peripherer Lage erkennen. Die Spermatogonien waren entweder einzeln oder in kleinen Gruppen mit bis zu vier Zellen in somatische Zellen eingebettet. Die somatischen Zellen waren deutlich kleiner als die Spermatogonien und besaßen einen kleinen unregelmäßig geformten Kern in zentraler Lage. Ab dem Reifestadium II (Abb. 30) waren die Tubuli seminiferi und die Keimzysten, die die einzelnen Stadien der Spermatogenese in Gruppen zusammenfassen, deutlich zu erkennen. Die innerhalb der Tubuli liegenden somatischen Zellen, welche zusammen mit den Keimzellen und der Zystenwand eine Spermiozyste bilden, wiesen eine längliche Gestalt, einen unregelmäßig geformten, dunkleren Kern und einen schmalen Zytoplasma-

saum auf. Bei Hodengewebe des Reifegrads II (Abb. 30) fanden sich neben den Spermato-
gonien sowohl primäre Spermatozyten, welche größer als die Spermato-
gonien und eosinophil gefärbt waren, als auch die etwas kleineren sekundären Spermatozyten. Letztere
waren durch ein eosinophiles Zytoplasma und ein basophiles Kernchromatin gekennzeich-
net. Beiden gemeinsam war der runde Kern in zentraler Lage. Spermatisden und Spermato-
zoen fanden sich im Reifestadium III (Abb. 31, Abb. 32). Die Spermatisden waren die klein-
sten Zellen der Spermato-
genesereihe. Die Spermatozoen stellten sich, je nach dem ob sie
quer oder längs angeschnitten waren, als kleine Punkte oder fädige Strukturen dar.

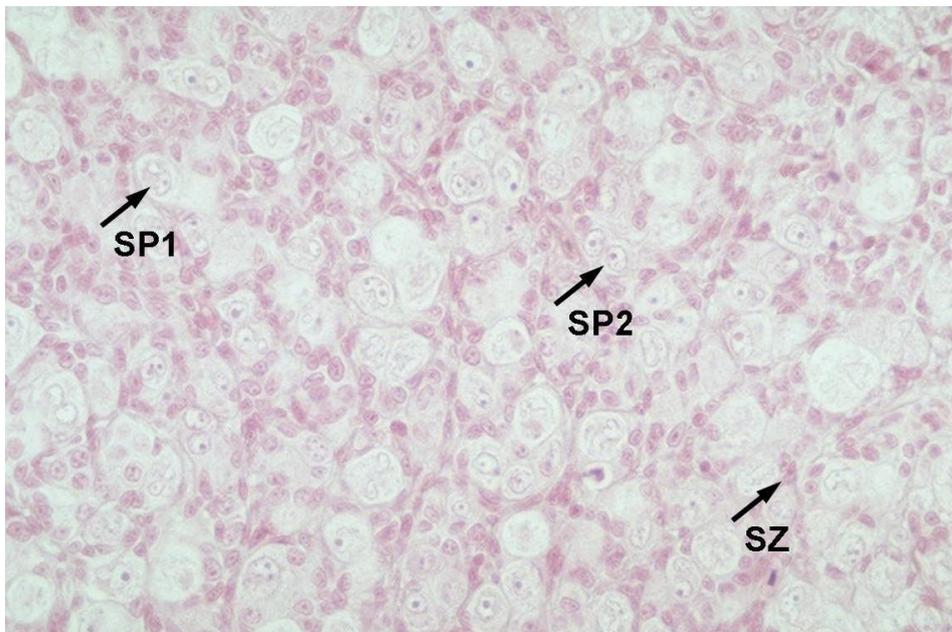


Abb. 29 *Xenopus laevis*, Hodengewebe: gonadaler Reifegrad I
somatische Zellen (SZ), Spermato-
gonien-Typ I (SP1), Spermato-
gonien-Typ II (SP2)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400

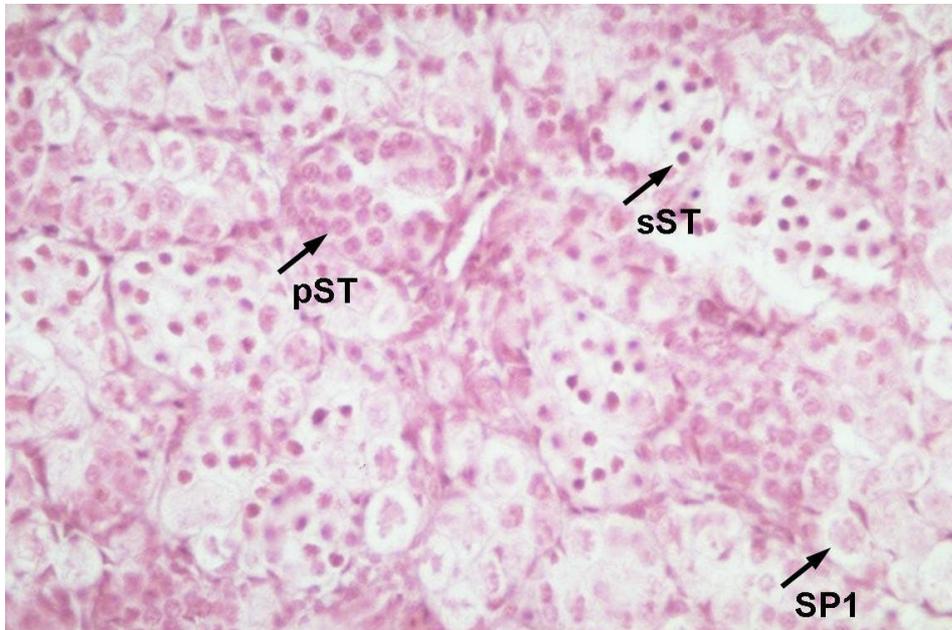


Abb. 30 *Xenopus laevis*, Hodengewebe: gonadaler Reifegrad II
Spermatogonien-Typ I (SP1), primäre Spermatozyten (pST), sekundäre Spermatozyten (sST)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

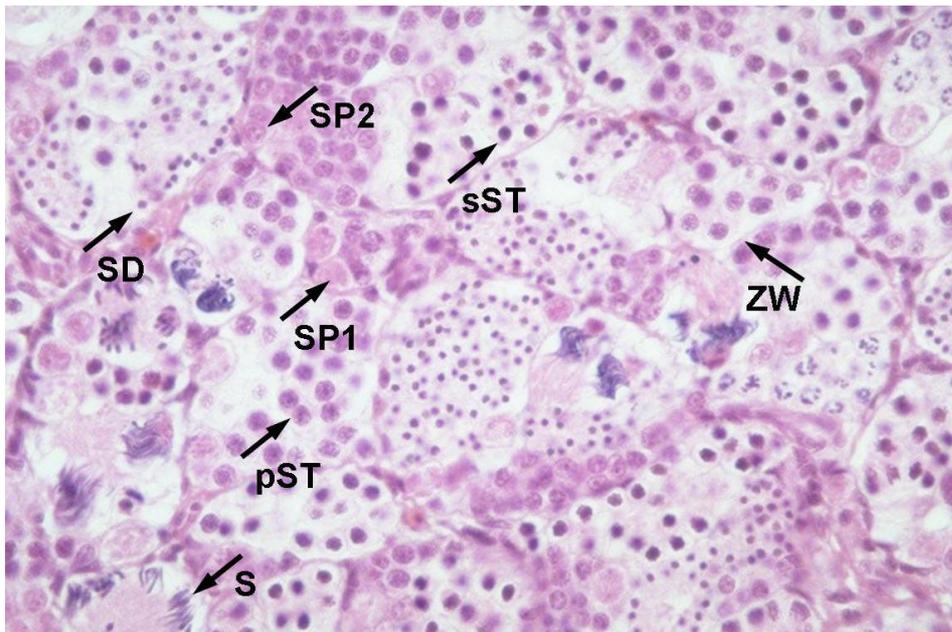


Abb. 31 *Xenopus laevis*, Hodengewebe: gonadaler Reifegrad III
Spermatogonien vom Typ I (SP1) und Typ II (SP2), primäre (pST) und sekundäre Spermatozyten (sST), Spermatischen (SD), Spermatozoen (S), Keimzystenwand (ZW)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

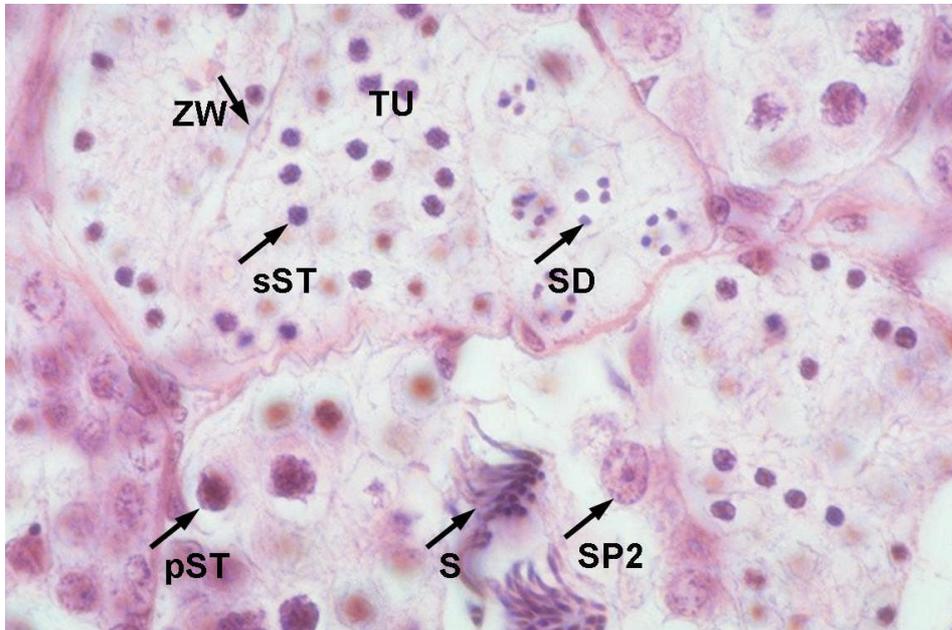


Abb. 32 *Xenopus laevis*, Hodengewebe: gonadaler Reifegrad III
 Spermato gonien –Typ II (SP2), primäre Spermatozyten (pST), sekundäre
 Spermatozyten (sST), Spermatiden (SD), Spermatozoen (S), Tubulus (TU),
 Zystenwand (ZW) der Spermiozyste
 Färbung: HE, Primärvergrößerung: 1000x

Pathologischen Befunde

Bei einigen Tieren fanden sich Gonaden sowohl mit männlichen als auch weiblichen morphologischen Strukturen (Abb. 33). Bei allen diesen Hermaphroditen dominierten jedoch männliche Strukturen. Es fanden sich Tubuli seminiferi, Spermato gonien und bei einigen auch Spermatozyten. In diese Strukturen waren gelegentlich Oozyten eingebettet. Die Oozyten befanden sich im Frühstadium der Entwicklung, waren aber im Vergleich zu den Oozyten der gleichaltrigen weiblichen Tiere deutlich kleiner.

Auch bei den Krallenfröschen wurden herdförmige lymphozytäre Infiltrate unterschiedlicher Ausdehnung und Anzahl in weiblichem Gonadengewebe beobachtet (Abb. 34).

Einige der untersuchten Ovarien wiesen eine mittel- bis hochgradige Oozytendegeneration auf (Abb. 35). Die Oozyten zeigten Formverlust, Karyolyse und Durchmischung von Plasmabestandteilen. Die Degenerationserscheinungen wurden teilweise von einer zellulären Reaktion begleitet.

Zwei männliche Tiere der 2:1-Versuchsgruppe wiesen in Teilen des Gonadengewebes Veränderungen auf (Abb. 36). In diesen Bereichen fanden sich, neben einigen Spermato gonien, fast ausschließlich somatische Zellen und Reste von degenerierten Spermato gonien. Weiterhin zeigten sich Hohlräume, welche von somatischen Zellen umgeben waren.

Das Gonadengewebe eines weiblichen Tieres der 2:1-Versuchsgruppe wies, neben einer für Ovarien typischen Struktur mit Oogonien und Oozyten, Bereiche mit einer großen Anzahl an somatischen Zellen und Bindegewebe auf (Abb. 37). In diesen Arealen fanden sich Reste degenerierter Keimzellen.

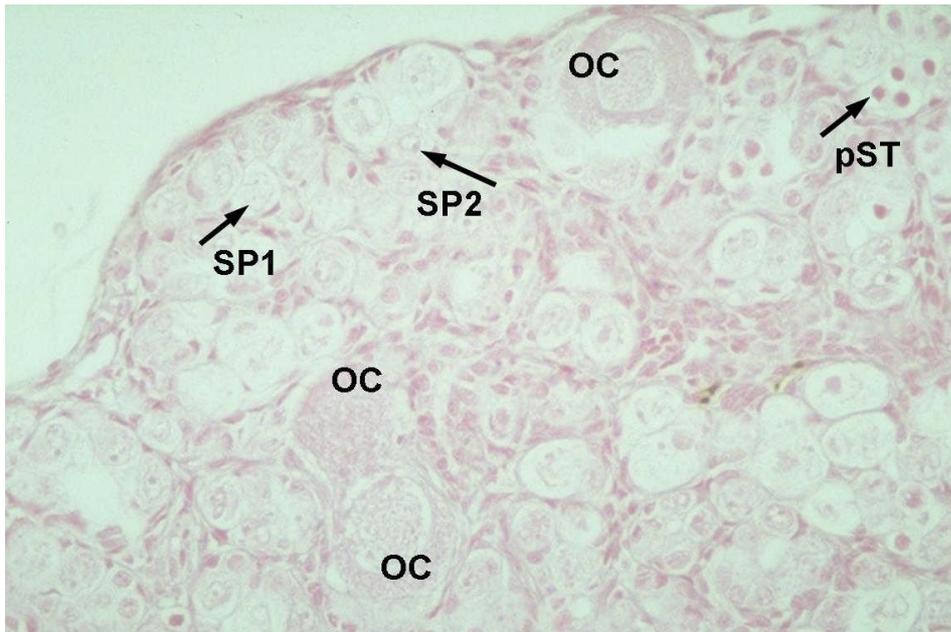


Abb. 33 *Xenopus laevis*, Hermaphrodit

Spermatogonien-Typ I (SP1) und Typ II (SP2); primäre Spermatozyten (pSP), Oozyten (OC)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

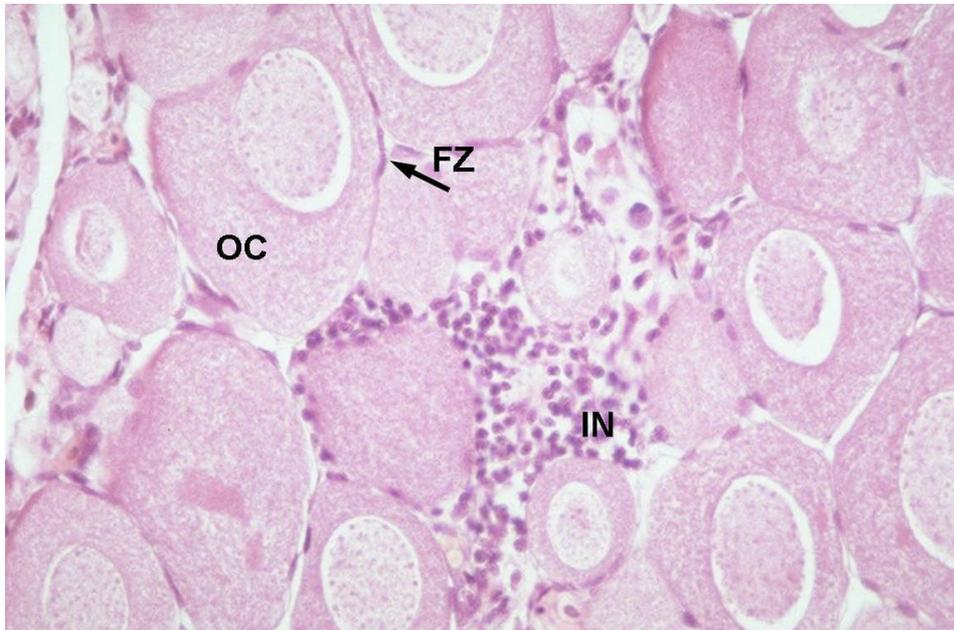


Abb. 34 *Xenopus laevis*, Ovarialgewebe: lymphozytäres Infiltrat (IN)
Oozyten (OC), Follikelzellschicht (FZ)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

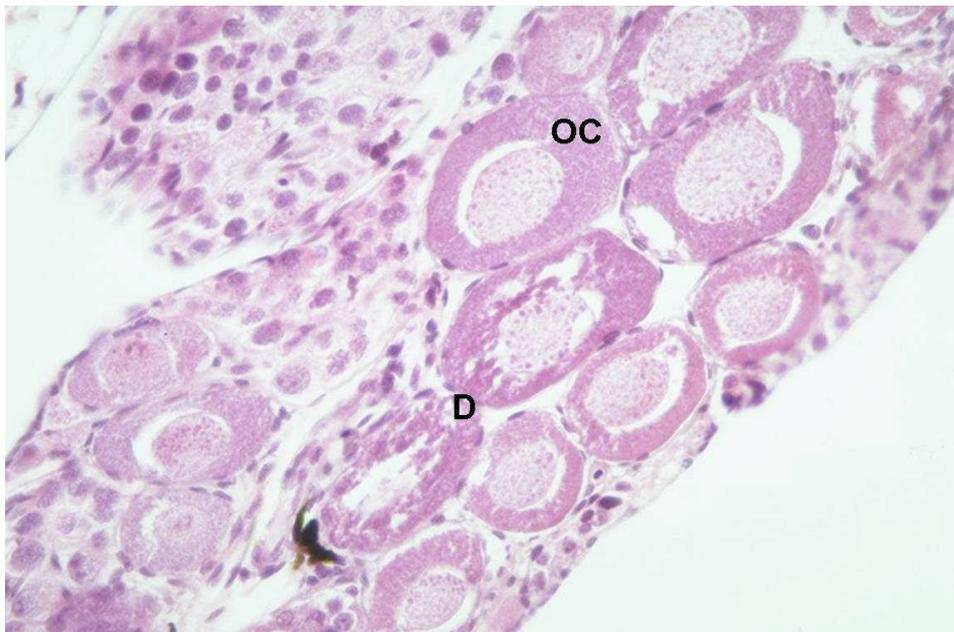


Abb. 35 *Xenopus laevis*, Ovarialgewebe: Oozytendegeneration (D)
Oozyten (OC)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

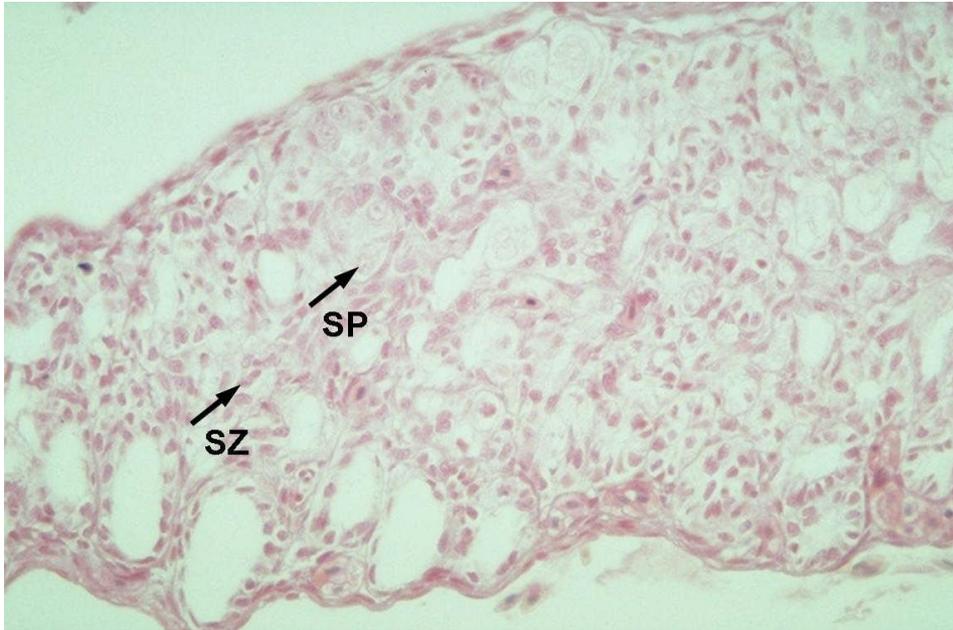


Abb. 36 *Xenopus laevis*, Hodengewebe
zahlreiche somatische Zellen (SZ), Spermatogonien (SP)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

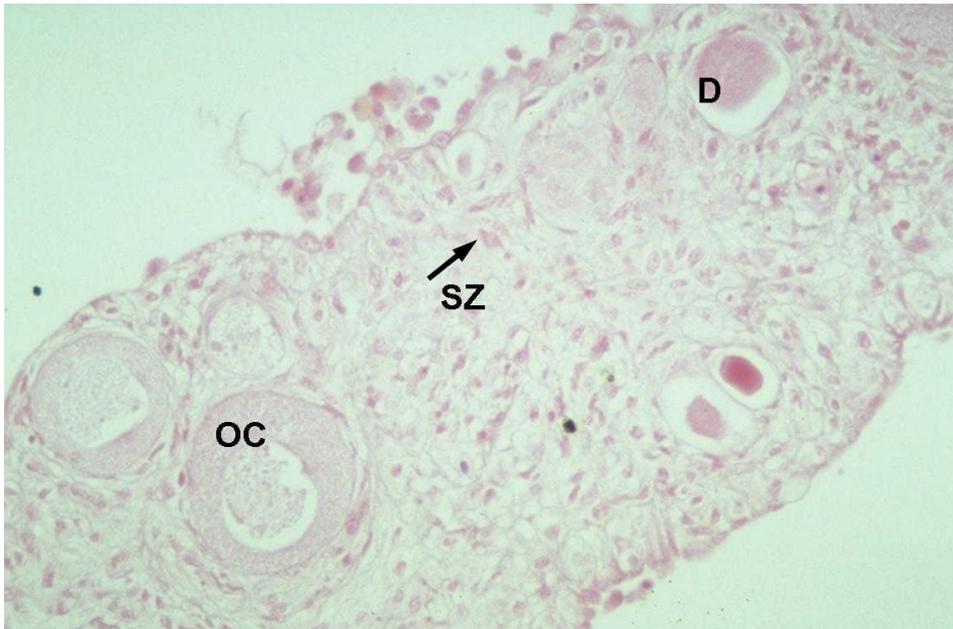


Abb. 37 *Xenopus laevis*, Ovarialgewebe
zahlreiche somatische Zellen, Oozyten, Oozytendegeneration (D)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

4.3.1.4. Gruppe Ib: *Xenopus laevis* – Geschlechterverhältnis und gonadaler Reifegrad

Die Bestimmung des gonadalen Reifegrades bei *Xenopus laevis* ergab die in Tab. 19 aufgeführten Ergebnisse. Bei den männlichen Tieren fanden sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den zwei Versuchsgruppen alle drei gonadalen Reifegrade. Eine detaillierte Beschreibung erfolgte unter Kap.4.3.1.3. Die männlichen Tiere mit dem gonadalen Reifegrad I wiesen ausschließlich somatische Zellen und Spermatogonien im Hodengewebe auf. Hodengewebe, welches den gonadalen Reifegrad II aufwies, ließ neben Spermatogonien bereits Spermatozyten erkennen. Auch waren bereits Keimzysten nachweisbar, in denen jeweils Keimzellen eines Reifegrades von einer Membran umschlossen waren und somit eine Zyste bildeten. Männliches Hodengewebe mit gonadalem Reifegrad III zeigte neben Spermatozyten auch Spermatisden und Spermatozoen, die sich ebenfalls in Zysten befanden. Weibliches Hodengewebe wies bei allen Gruppen durchgehend den gonadalen Reifegrad I auf, das heißt die Oozyten befanden sich im Frühstadium der Oogenese.

Tab. 19 Bestimmung des gonadalen Reifegrades bei *Xenopus laevis* (Gruppe Ib, Expositionsversuch) nach Exposition in verschiedenen Abwasserverdünnungen und Würmwasser (Kontrolle)

Replikat	n	Reifestadium (m)				Reifestadium (w)				HA
		m	I	II	III	w	I	II	III	
K _A	4	2	2	0	0	2	2	0	0	0
K _B	32	10	1	6	3	20	20	0	0	2
K _C	35	16	1	10	5	18	18	0	0	1
K-ges.	71	28	4	16	8	40	40	0	0	3
			14,3%	57,1%	28,6%		100,0%	0,0%	0,0%	
12:1 _A	82	35	11	19	5	47	47	0	0	0
12:1 _B	35	16	5	6	5	18	18	0	0	1
12:1 _C	14	6	1	3	2	8	8	0	0	0
12:1-ges.	131	57	17	28	12	73	73	0	0	1
			29,8%	49,1%	21,1%		100,0%	0,0%	0,0%	
2:1 _A	26	14	0	3	11	12	12	0	0	0
2:1 _B	46	23	11	10	2	21	21	0	0	2
2:1 _C	33	16	0	8	8	17	17	0	0	0
2:1-ges.	105	53	11	21	21	50	50	0	0	2
			20,8%	39,6%	39,6%		100,0%	0,0%	0,0%	

n: Gesamtzahl der untersuchten Tiere; m: männlich; w: weiblich; Stadium (m)/(w): gonadaler Reifegrad der männlichen/weiblichen Tiere; I,II,III: Stadien der Gonadenreifung

Die Geschlechterverteilung der einzelnen Gruppen ist in Tab. 20 aufgeführt und in Abb. 38 grafisch dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden nicht festgestellt. Tendenziell war der Anteil weiblicher Tiere bei der Kontrolle am höchsten (56,3%), gefolgt von der 12:1-Versuchsgruppe (55,7%) und der 2:1 Gruppe (47,6%). Der Anteil männlicher Tiere verhielt sich entsprechend umgekehrt proportional.

Tab. 20 Geschlechterverteilung bei *Xenopus laevis* (Gruppe Ib, Expositionsversuch) nach Exposition in verschiedenen Abwasserverdünnungen und Würmwasser (Kontrolle)

Replikat	Alter (Monate)	n	m (%)	w (%)	HA (%)
K _A	4	4	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)
K _B	4	32	10 (31%)	20 (63%)	2 (6%)
K _C	4	35	16 (46%)	18 (51%)	1 (3%)
K-ges.	4	71	28 (39,4%)	40 (56,3%)	3 (4,2%)
12:1 _A	4	82	35 (43%)	47 (57%)	0 (0%)
12:1 _B	4	35	16 (46%)	18 (51%)	1 (3%)
12:1 _C	4	14	6 (43%)	8 (57%)	0 (0%)
12:1-ges.	4	131	57 (43,5%)	73 (55,7%)	1 (0,8%)
2:1 _A	4	26	14 (54%)	12 (46%)	0 (0%)
2:1 _B	4	46	23 (50%)	21 (46%)	2 (4%)
2:1 _C	4	33	16 (48%)	17 (52%)	0 (0%)
2:1-ges.	4	105	53 (50,5%)	50 (47,6%)	2 (1,9%)

n: Anzahl der Tiere; m: männlich; w: weiblich; HA: Hermaphroditen

Neben eindeutig männlich oder weiblich differenzierten Gonaden fand sich auch Gonadengewebe mit intersexuellem Charakter (Hermaphroditen) (Tab. 20). Während der Anteil von Hermaphroditen innerhalb der Kontrollgruppe bei 4,2% lag, wiesen in der 12:1-

Versuchsgruppe 0,8% und in der 2:1-Versuchsgruppe 1,9% Mischgonaden auf. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden nicht festgestellt.

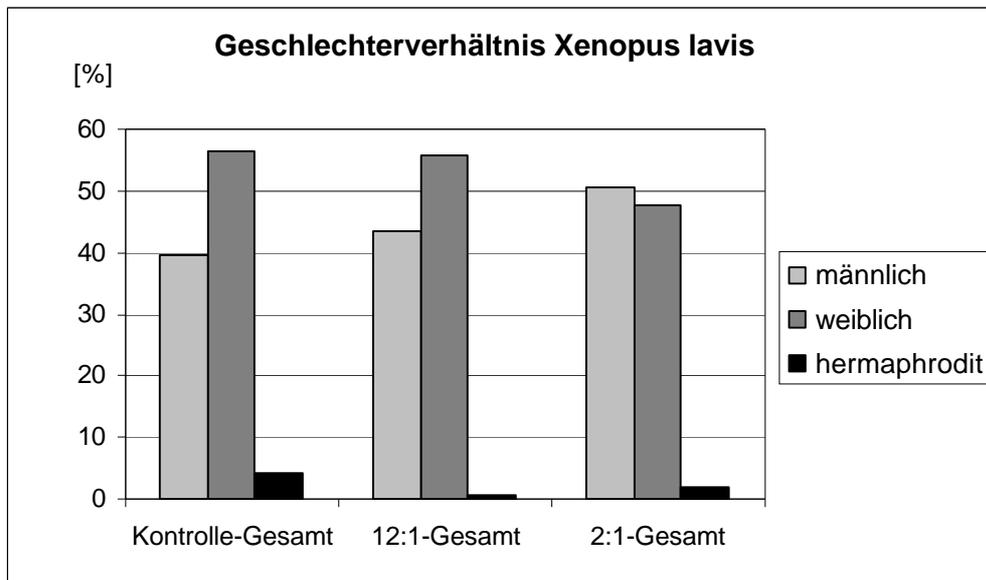


Abb. 38 Geschlechterverhältnis von *Xenopus laevis* (Gruppe Ib, Expositionsversuch) nach Exposition in verschiedenen Abwasserverdünnungen und Würmwasser (Kontrolle)

4.3.2. Gruppe II: *Rana temporaria* (Kontrollgruppe)

Von allen 62 Grasfröschen der Gruppe II wurde eine lichtmikroskopische Untersuchung von Gonadengewebe vorgenommen. Es handelte sich dabei um 1,5 jährige Tiere, die aus einem unbelasteten Gewässer der Versuchsanlage Wielenbach stammten. Das Hodengewebe der 24 männlichen, subadulten Tiere zeigte den gonadalen Reifegrad I. Außer Spermatogonien waren keine Zellen der Spermatogenese zu erkennen. Die tubuläre Struktur war deutlich ausgeprägt. Die Gonaden der 18 weiblichen Tiere wiesen den Reifegrad I auf, das heißt die Oozyten befanden sich noch in der Frühphase. Im Vergleich zu den Oozyten der juvenilen Tiere der Gruppe Ia zeigten diese eine Volumenzunahme, ein Dotterkern war im Zytoplasma jedoch noch nicht zu erkennen.

Neben männlichen und weiblichen Tieren wurden wiederum Individuen mit intersexuellem Charakter (Hermaphroditen) beobachtet. Bei sechs der Hermaphroditen lag Transformationsstadium I, das heißt eine beginnende Einwanderung von Medullargewebe, vor. 14 Hermaphroditen wiesen das Transformationsstadium III auf (Tab. 21). Diese Tiere ließen im ganzen Organ verteilt Spermatogonien und somatische Zellen sowie eine fortgeschrittene Oozytendegeneration erkennen.

Tab. 21 Gruppe II: Geschlechterverteilung, gonadaler Reifegrad und Transformationsstadien

Geschlecht	Alter (Jahre)	n	gonadaler Reifegrad		
			I	II	III
m	1,5	24	24	-	-
w	1,5	18	18	-	-
			Transformationsstadium		
			I	II	III
HA	1,5	20	6	-	14

m: männlich; w: weiblich; HA: Hermaphrodit; n: Anzahl der Tiere

Histopathologische Befunde

Bei einigen der weiblichen Gonaden konnte eine Oozytendegeneration mit Formverlust und Karyolyse beobachtet werden. Begleitende zelluläre Reaktionen waren nicht zu erkennen.

Bei einem Tier wurde ein herdförmiges, lymphozytäres Infiltrat im Bereich des Ovars diagnostiziert.

4.3.3. Zusatzgruppen

Innerhalb der Zusatzgruppen wurde von insgesamt 137 Grasfröschen Gonadengewebe lichtmikroskopisch untersucht. Das Geschlecht und der gonadale Entwicklungsgrad wurden bestimmt. Bei den 4 und 16,5 Monate alten Tieren der hochalpinen Populationen (Gruppe IIIa und IIIc), sowie den 18 Monate alten Mittellandfröschen der Gruppe IIIb traten generell keine Hermaphroditen auf, so dass eine Einstufung in die bei Gruppe I und II beobachteten Transformationsstadien unterblieb.

Tab. 22 Geschlechterverteilung und gonadaler Reifegrad bei Grasfröschen der Zusatzgruppen

Gruppe	Alter (Monate)	n	m	Stadium (m)			w	Stadium(w)			HA
				I	II	III		I	II	III	
IIIa	4	54	19	19	-	-	35	35	-	-	-
IIIb	18	50	19	19	-	-	31	31	-	-	-
IIIc	16,5	33	16	16	-	-	17	17	-	-	-

n: Anzahl der untersuchten Tiere; m: männlich; Stadium (m): Reifegrad der männlichen Gonaden; w: weiblich; Stadium (w): Reifegrad der weiblichen Gonaden; I,II,III: Stadien der Gonadenreife

4.3.3.1. Gruppe IIIa

Die untersuchten 54 Grasfrösche stammten aus einer hochalpinen Population (Maloja-Pass, Schweiz) und waren zum Untersuchungszeitpunkt ca. 4 Monate alt.

Das Hodengewebe der 19 männlichen Tiere war dem Reifegrad I zuzuordnen, da ausschließlich Spermatogonien und somatische Zellen vorhanden waren. Die Gonaden der 35 weiblichen Tiere befanden sich ebenfalls im Reifestadium I. Neben den zahlreichen Oogonien waren Oozyten in der Frühphase zu beobachten.

Die Morphologie des Hodengewebes unterschied sich zum Untersuchungszeitpunkt nicht von der der Gruppe Ia (Kap. 4.3.1.1). Gleiches gilt für das Ovarialgewebe. Im Gegensatz zu den untersuchten gleichaltrigen Tieren einer Mittellandpopulation (Gruppe Ia) fanden sich in dieser Gruppe keine Hermaphroditen bzw. Transformationsstadien (siehe Tab. 22).

4.3.3.2. Gruppe IIIb

Die 50 Tiere der Gruppe IIIb waren zum Untersuchungszeitpunkt 18 Monate alt (subadult) und stammten aus einer Mittellandpopulation bei Zürich.

Das Hodengewebe der 19 männlichen Tiere wies den Reifegrad I auf (Abb. 39). Im Gegensatz zu den Hoden der juvenilen Tiere (Gruppe Ia) war die tubuläre Struktur deutlicher ausgeprägt.

Die Gonaden der 31 weiblichen Tieren waren ebenfalls alle dem gonadalen Reifegrad I zuzuordnen (Abb. 40, Abb. 41). Im Vergleich zu den Oozyten der juvenilen Tiere hatte sich das Volumen vervielfacht, ein Dotterkern war jedoch noch nicht sichtbar. Die Kerne ließen bei einigen der Oozyten zahlreiche, in einer Kernhälfte lokalisierte Nukleoli erkennen. Das Follikelepithel erwies sich nach wie vor als einschichtig und abgeflacht.

Die 50 Tieren waren alle eindeutig einem Geschlecht zuzuordnen, Hermaphroditen fanden sich nicht (siehe Tab. 22).

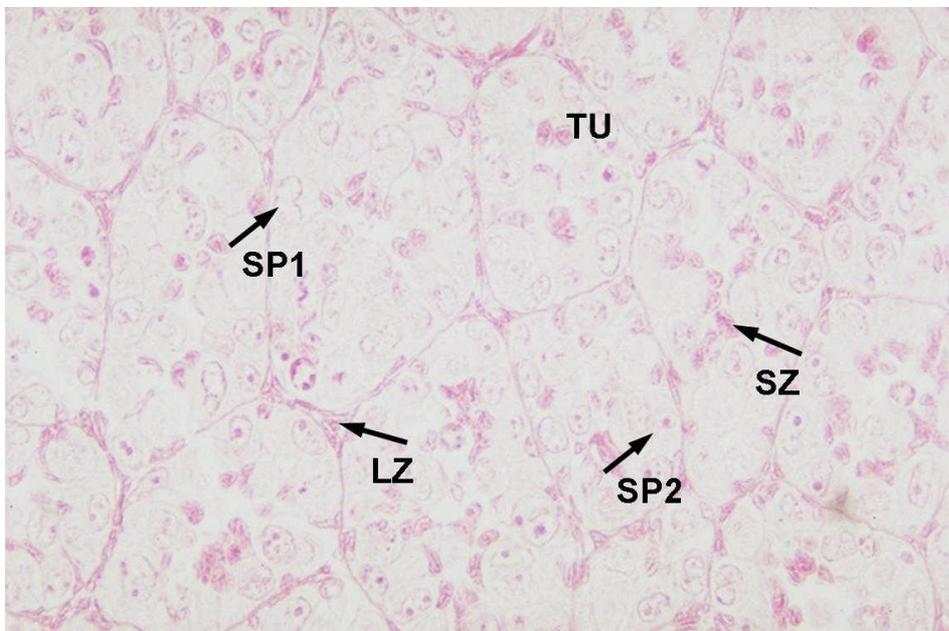


Abb. 39 *Rana temporaria* (subadult), Hodengewebe

Spermatogonien-Typ I (SP1), Spermatogonien-Typ II (SP2), Tubulus (TU),

Leydig'sche Zwischenzellen (LZ), Sertoli-Zellen (SZ)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

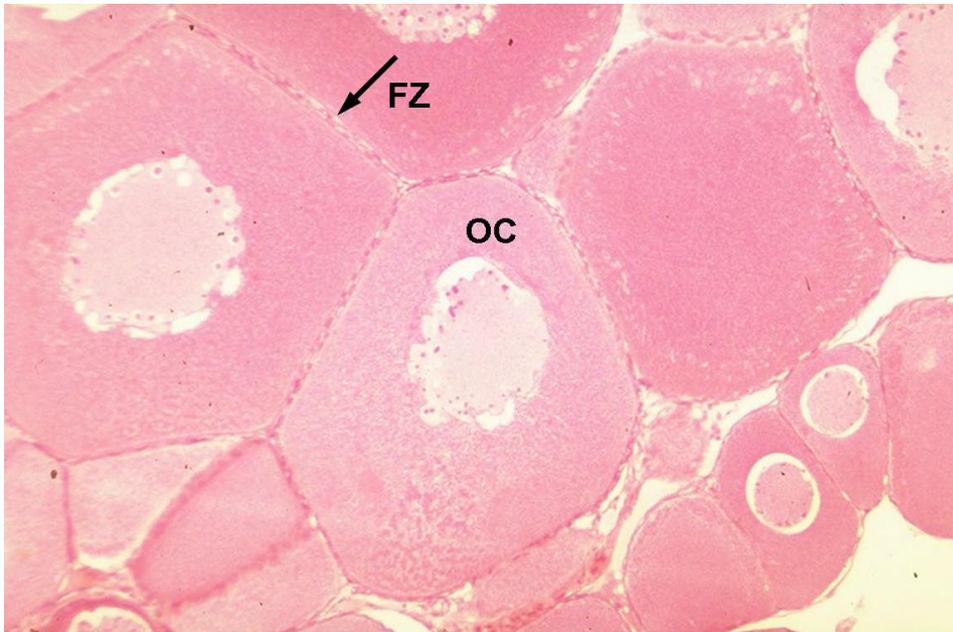


Abb. 40 *Rana temporaria* (subadult), Ovarialgewebe

Oozyten (OC) mit Follikelzellschicht (FZ)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 100x

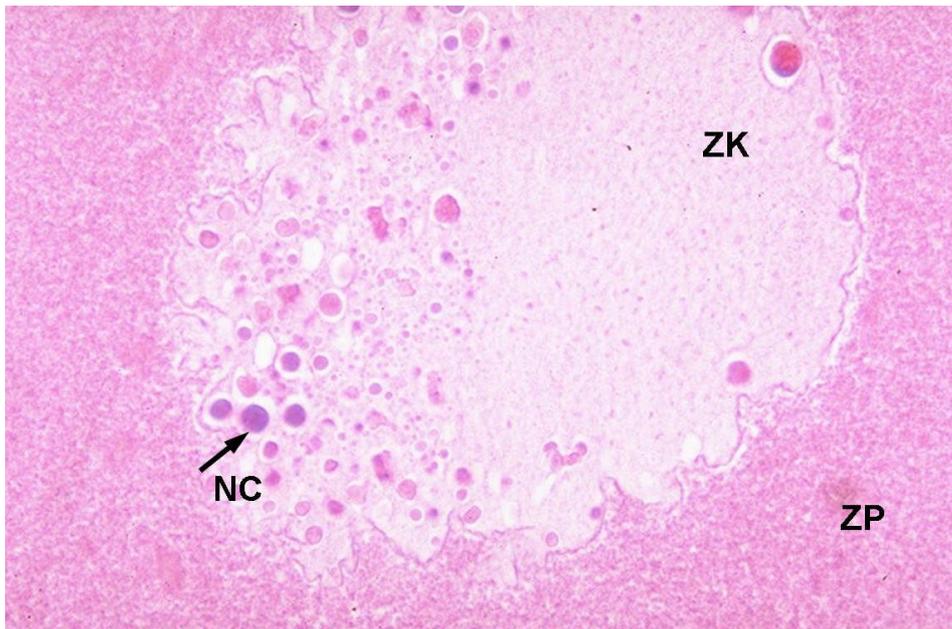


Abb. 41 Oozyte von *Rana temporaria* (subadult)

Zellkern (ZK) mit peripher liegenden Nukleoli (NC), Zytoplasma (ZP)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 250x

4.3.3.3. Gruppe IIIc

Von dieser Gruppe wurden 33 Tiere lichtmikroskopisch untersucht. Zum Untersuchungszeitpunkt waren die Frösche, die aus einer hochalpinen Population (Maloja) stammten, ca. 16,5 Monate alt. Die Hoden der 16 männlichen Tiere wiesen alle Reifegrad I auf. Die 17 weiblichen Tiere waren hinsichtlich ihrer gonadalen Entwicklung ebenfalls alle dem Reifegrad I zuzuordnen. Bei beiden Geschlechtern war das Gonadengewebe morphologisch mit dem der Gruppe IIIb vergleichbar. Hermaphroditen traten nicht auf (siehe Tab. 22).

4.3.3.4. Histopathologische Untersuchung des Gonadengewebes der Zusatzgruppen

In allen drei Zusatzgruppen konnte bei einigen der weiblichen Gonaden eine Oozytendegeneration mit Formverlust der Zellen und Karyolyse in unterschiedlich starker Ausprägung beobachtet werden (Abb. 42). Mit der Degeneration ging zum Teil eine deutliche zelluläre Reaktion einher (Abb. 43).

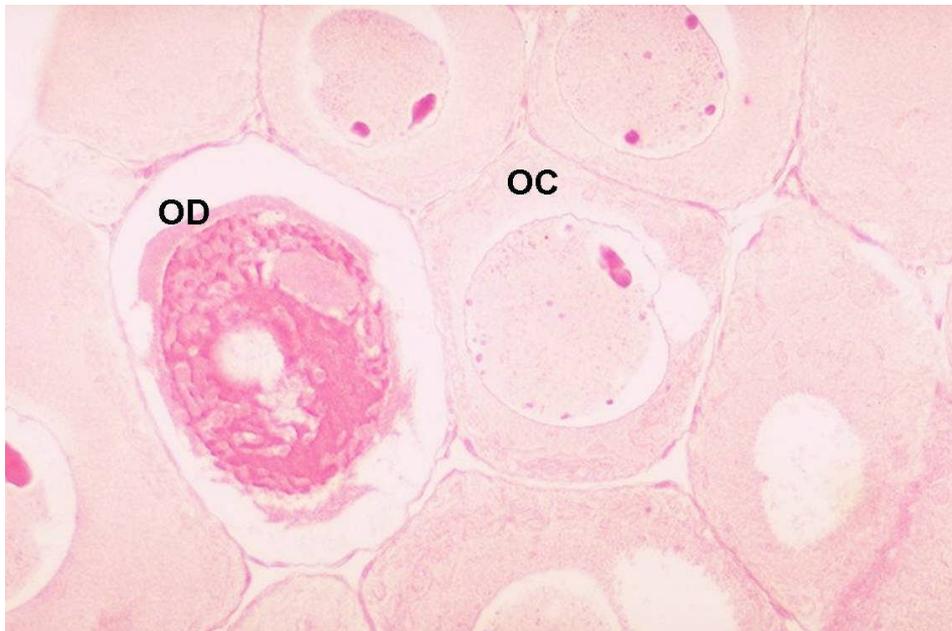


Abb. 42 *Rana temporaria* (subadult), Ovarialgewebe: Oozytendegeneration (OD), unveränderte Oozyten (OC)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 250x

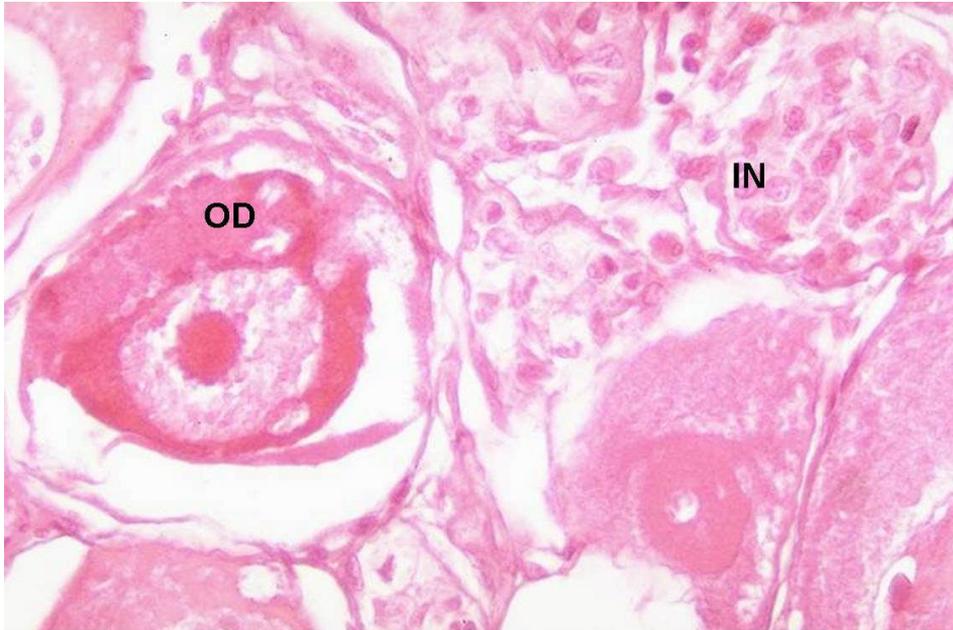


Abb. 43 *Rana temporaria* (subadult), Ovarialgewebe: Oozytendegeneration (OD) und zelluläres Infiltrat (IN)

Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

4.4. Semiquantitativer Nachweis der Vitellogenin-mRNA mittels RT-PCR bei *Xenopus laevis* (Gruppe Ib)

Die Ergebnisse der semiquantitativen Bestimmung der Vg-mRNA mittels RT-PCR aus Leberproben von Krallenfröschen (Gruppe Ib) nach Exposition in Würmwasser und verschiedenen Abwasserverdünnungen sind in Tab. 23 aufgeführt und in Abb. 44 grafisch dargestellt. Die Angaben der Vg-mRNA-Level stellen Relativwerte im Vergleich zur Kontrolle (100%) dar.

Tab. 23 Bestimmung der Vitellogenin-mRNA von *Xenopus laevis* nach Exposition in verschiedenen Abwasserverdünnungen und Würmwasser (Kontrolle)

Gruppe	weibliche Tiere		männliche Tiere	
	Vg-mRNA [%]	Stabw.	Vg-mRNA [%]	Stabw.
Kontrolle	100	80	100	21
12:1	155	92	118	43
2:1	393*	53	93	52

Bei den weiblichen Tieren der 2:1-Versuchsgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Vg-mRNA im Vergleich zu Würmwasser-Kontrolltieren. Bei den Tieren der 12:1-Abwasserverdünnung lag die gemessene Vg-mRNA-Menge bei 155% des Kontroll-Vg-mRNA-Levels, ohne damit jedoch signifikant erhöht zu sein.

Bei den männlichen, Abwasser-exponierten Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die Tiere der 12:1-Abwasserverdünnung wiesen mit 113% einen geringfügig höheren Vg-mRNA-Level auf, während dieser bei den Tieren der 2:1-Abwasserverdünnung mit 93% etwas niedriger lag als bei den Kontrollen.

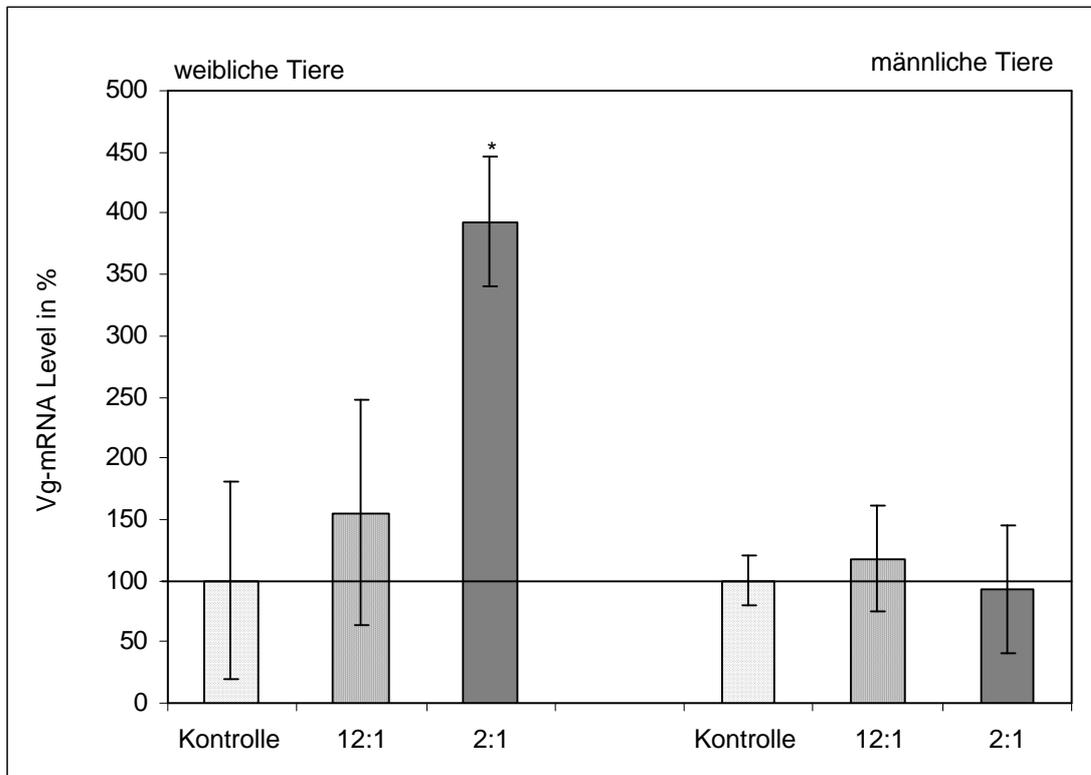


Abb. 44 *Semiquantitative Bestimmung der Vg-mRNA in Hepatozyten männlicher und weiblicher Tiere nach Exposition in verschiedenen Abwasserverdünnungen und Würmwasser (Kontrolle)*

4.5. Histopathologische Untersuchungsergebnisse

4.5.1. Histopathologische Befunde bei *Xenopus laevis*

Die histopathologische Untersuchung von Lunge, Milz, Magen-Darm-Trakt und äußerer Haut von Krallenfröschen aller Versuchs- und Kontrollansätze ergab keine von der Norm abweichenden Befunde. Lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen wurden ausschließlich an Leber und Niere beobachtet.

Im Bereich der Leber war, je nach Versuchsansatz, ein unterschiedlicher Gehalt des Speicherstoffs Glykogen nachweisbar. Während bei Kontrolltieren (Abb. 45, Abb. 47) der Glykogengehalt generell als hoch einzustufen war, wiesen alle zehn Tiere, die dem Kläranlagenabwasser in einer Verdünnung von 12:1 ausgesetzt waren, eine mittel- bis hochgradige Reduktion der Glykogenreserven auf (Abb. 46, Abb. 48). Gleichzeitig war bei neun dieser Tiere eine großtropfige Vakuolisierung von Hepatozyten und eine Disintegration der normalen Leberarchitektur zu beobachten (Abb. 49, Abb. 50). Bei Krallenfröschen, die dem Ab-

wasser in einer Verdünnung von 2:1 ausgesetzt waren, beschränken sich die Veränderungen in der Leber auf eine Glykogenspeicherung bei insgesamt zwei von zehn Tieren. Im Interstitium der Niere waren bei einzelnen Individuen aller Kontroll- und Versuchsgruppen hin und wieder fokale, entzündlich-zellige Infiltrate zu beobachten (Abb. 52). Innerhalb der Gruppe der Abwasserverdünnung 12:1 ließen sechs von zehn Individuen eine Vakuolisierung von Tubulusepithelzellen, verbunden mit einer Dilatation des Tubuluslumens (Abb. 54) sowie Einzelzellnekrosen im Tubulusepithel erkennen (Abb. 53). Innerhalb der Gruppe des 2:1-Verdünnungsansatzes war lediglich bei einem Frosch eine ausgeprägte Tubulusdilatation zu beobachten, während die übrigen Individuen eine dezente Vakuolisierung von Tubulusepithelzellen aufwiesen.

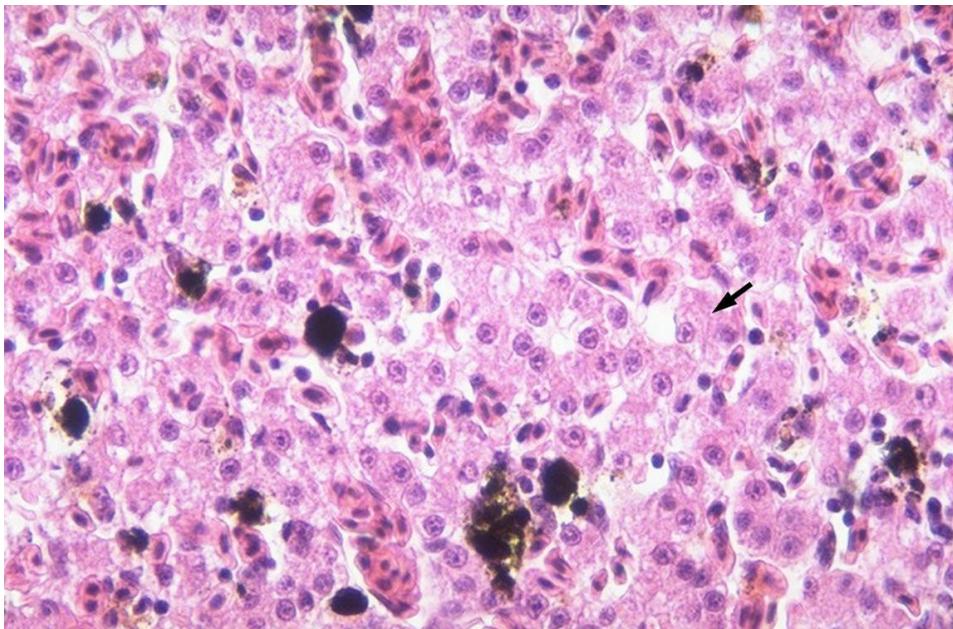


Abb. 45 *Xenopus laevis*, Kontrolleber: hoher Glykogengehalt
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

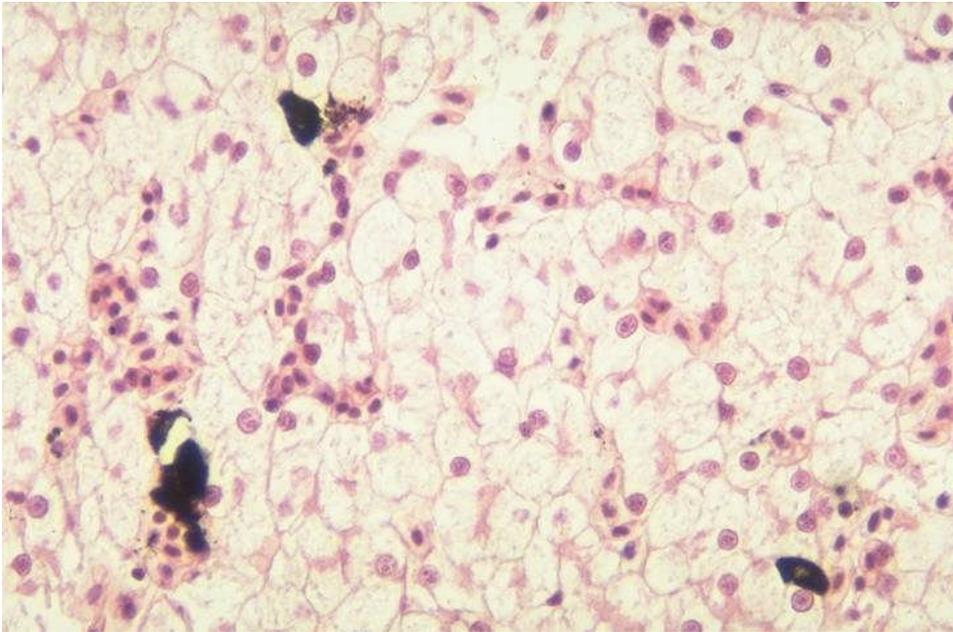


Abb. 46 *Xenopus laevis*, Leber: geringer Glykogengehalt
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

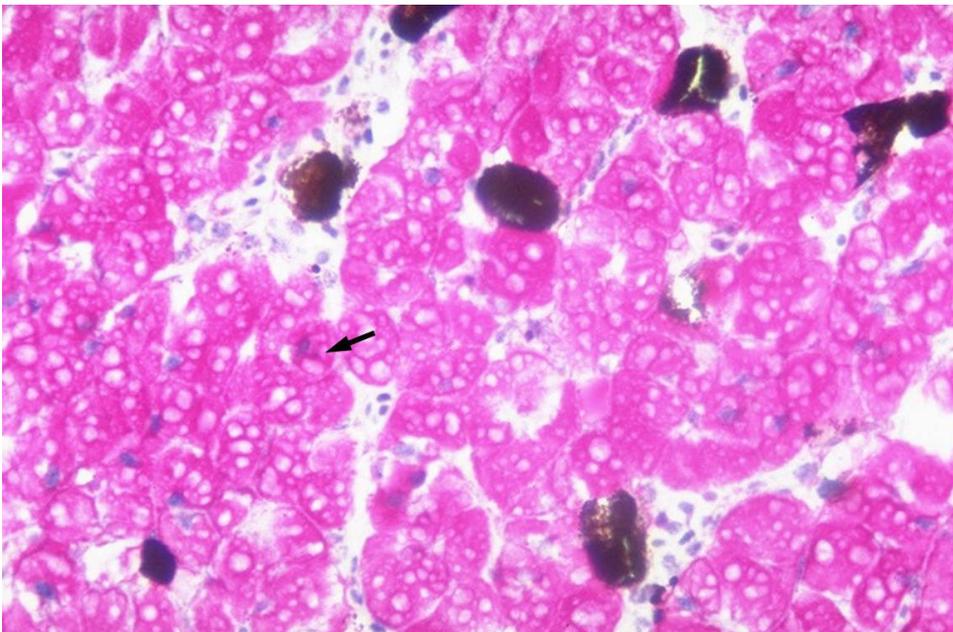


Abb. 47 *Xenopus laevis*, Kontrolleber: hoher Glykogengehalt
Färbung: PAS, Primärvergrößerung: 400x

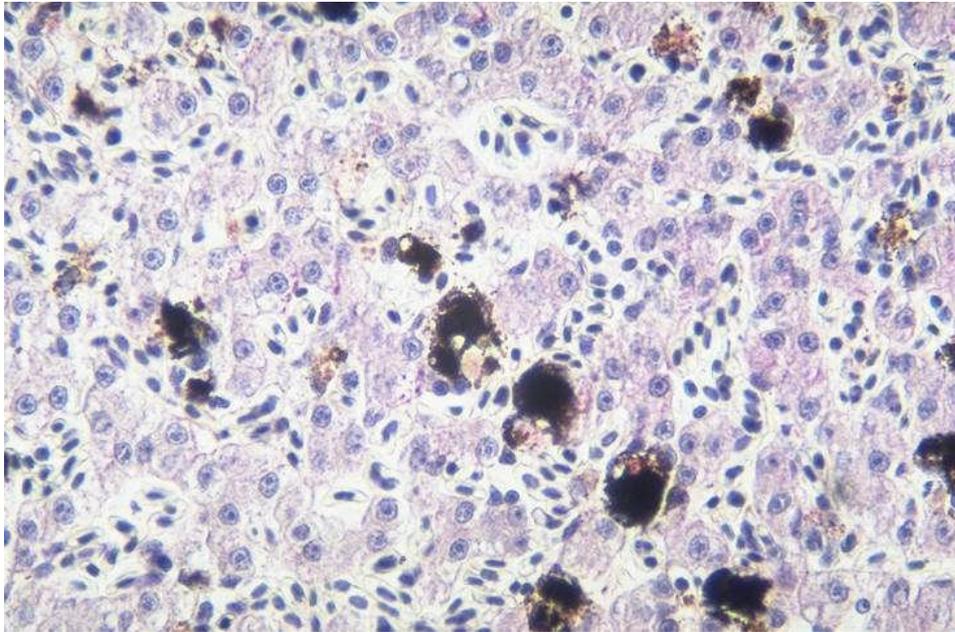


Abb. 48 *Xenopus laevis*, Leber: geringer Glykogengehalt
Färbung: PAS, Primärvergrößerung: 400x

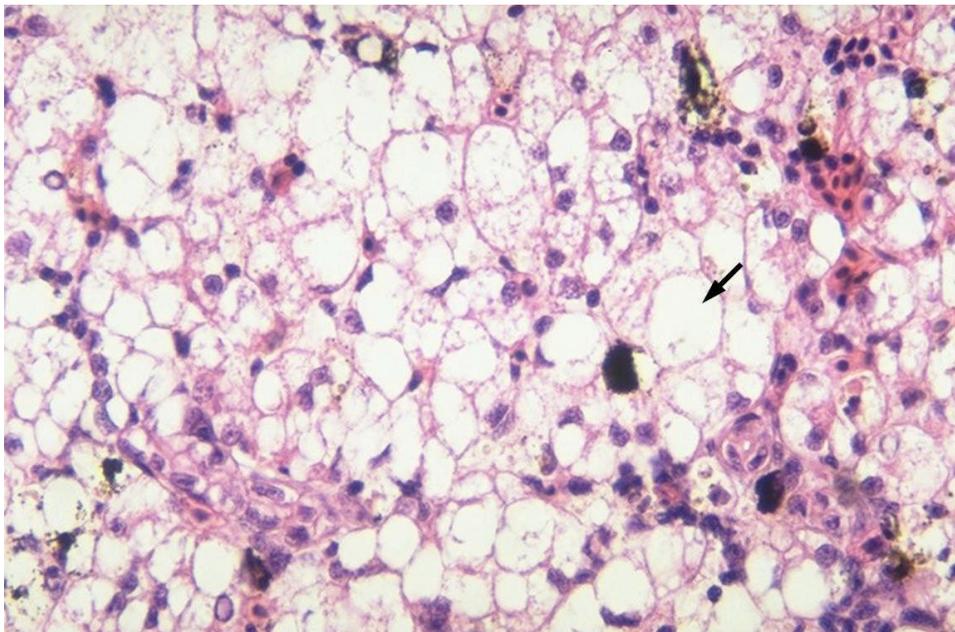


Abb. 49 *Xenopus laevis*, Leber: massive großtropfige Vakuolisierung,
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

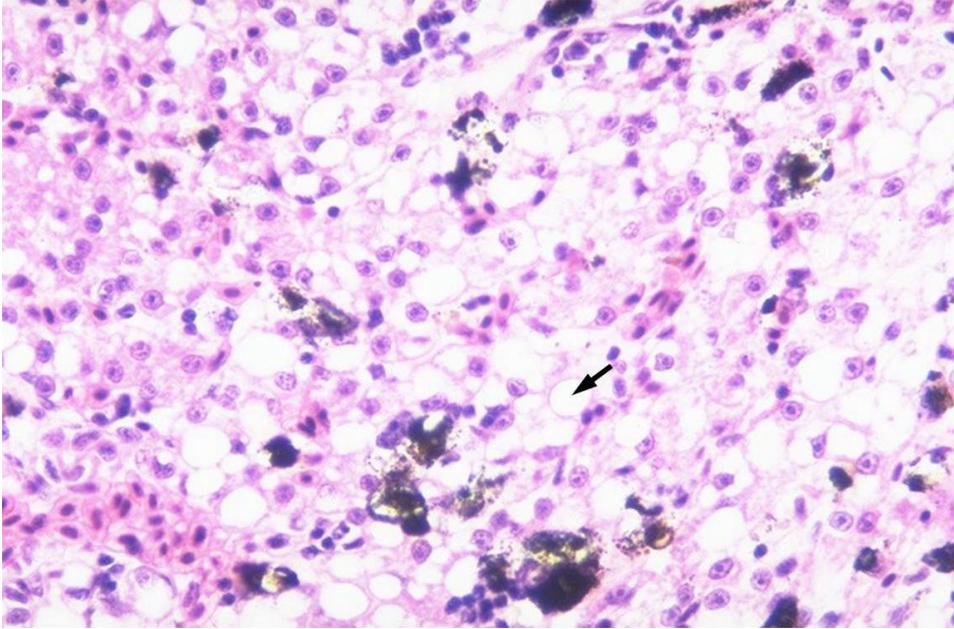


Abb. 50 *Xenopus laevis*, Leber: großtropfige Vakuolisierung
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

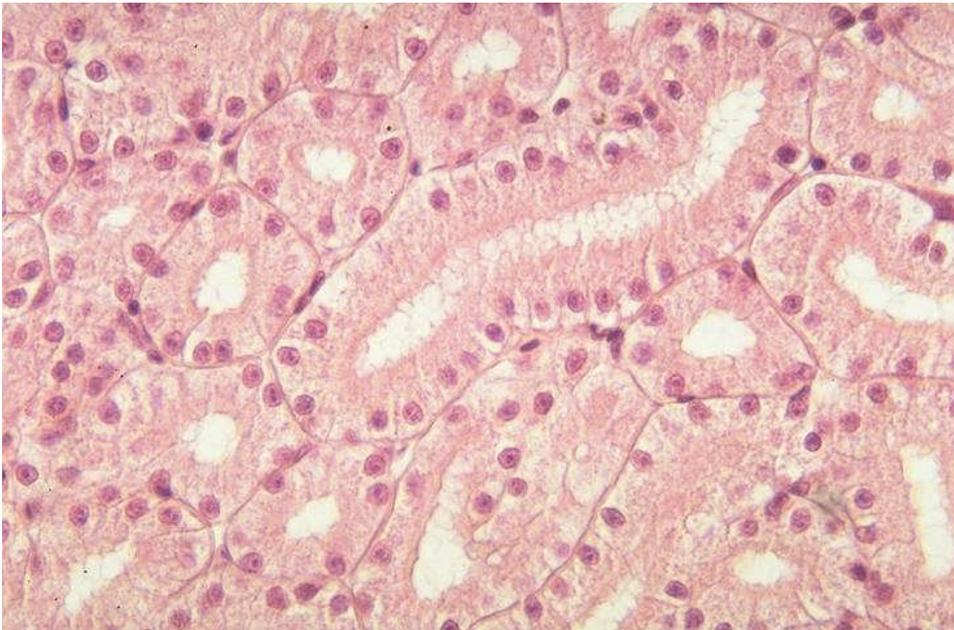


Abb. 51 *Xenopus laevis*, Kontrollniere
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

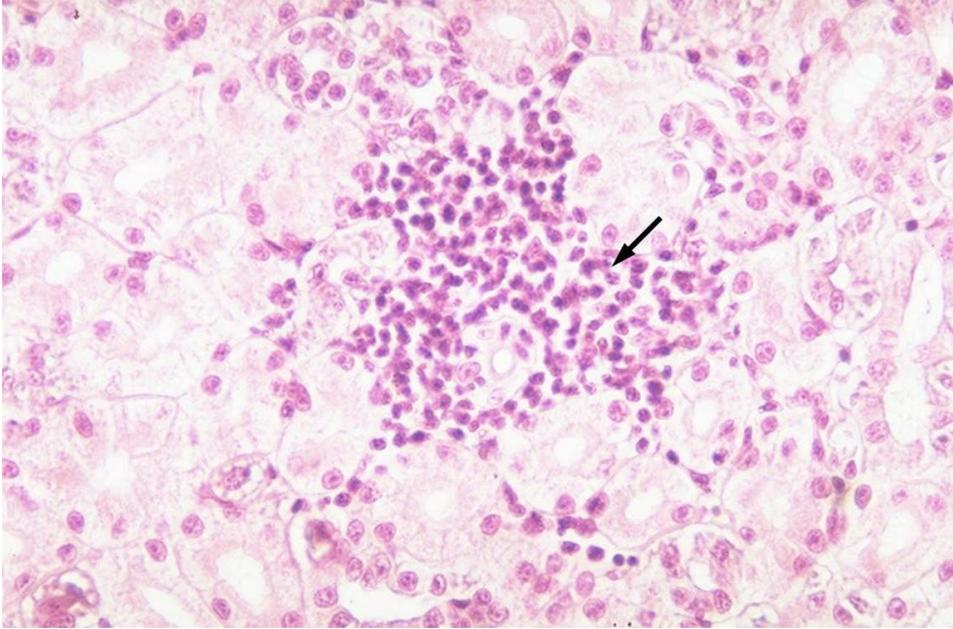


Abb. 52 *Xenopus laevis*, Niere: entzündliches Infiltrat
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

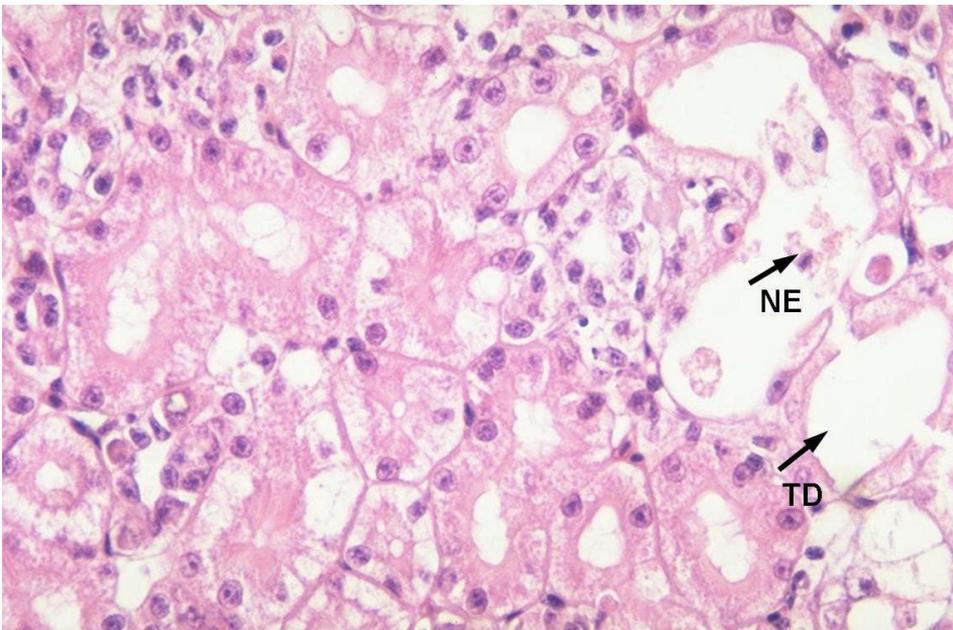


Abb. 53 *Xenopus laevis*, Niere: Nekrose von Tubulusepithelzellen (NE),
Tubulusdilatation (TD)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

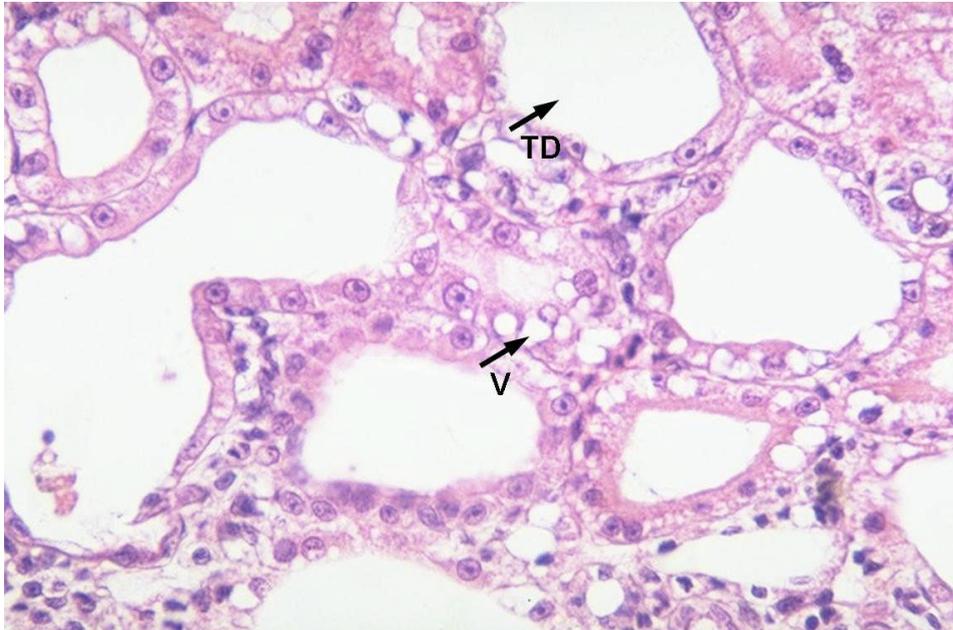


Abb. 54 *Xenopus laevis*, Niere: Vakuolisierung von Tubulusepithelzellen (V), Tubulusdilatation (TD)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

4.5.2. Histopathologische Befunde bei *Rana temporaria*

Bei den Grasfröschen beschränken sich die histopathologischen Veränderungen ebenfalls auf Leber und Niere. Die übrigen untersuchten Organe Milz, Lunge, Magen-Darm-Trakt und Haut ließen keine Organveränderungen erkennen.

Das Lebergewebe wies wiederum einen unterschiedlichen Gehalt an Glykogen auf. Im Gegensatz zu *Xenopus laevis* war bei Grasfröschen der Kontrollgruppe generell ein sehr geringer Gehalt an Glykogen in der Leber nachweisbar (Abb. 55, Abb. 57). Bei jeweils vier Tieren, die dem Kläranlagenabwasser in einer Verdünnung von 12:1 bzw. 2:1 ausgesetzt waren, erwies sich der Glykogengehalt als geringgradig erhöht (Abb. 56, Abb. 58). Bei drei Individuen der Kontrollgruppe waren eine Erweiterung der Lebersinus und Einzelzelluntergänge disseminiert im Leberparenchym nachweisbar.

Im Bereich der Niere war bei Grasfröschen aller Versuchs- und Kontrollgruppen ein gelegentliches Auftreten subkapsulär lokalisierter, „Granulom-artiger“ Gebilde zu beobachten (Abb. 60).

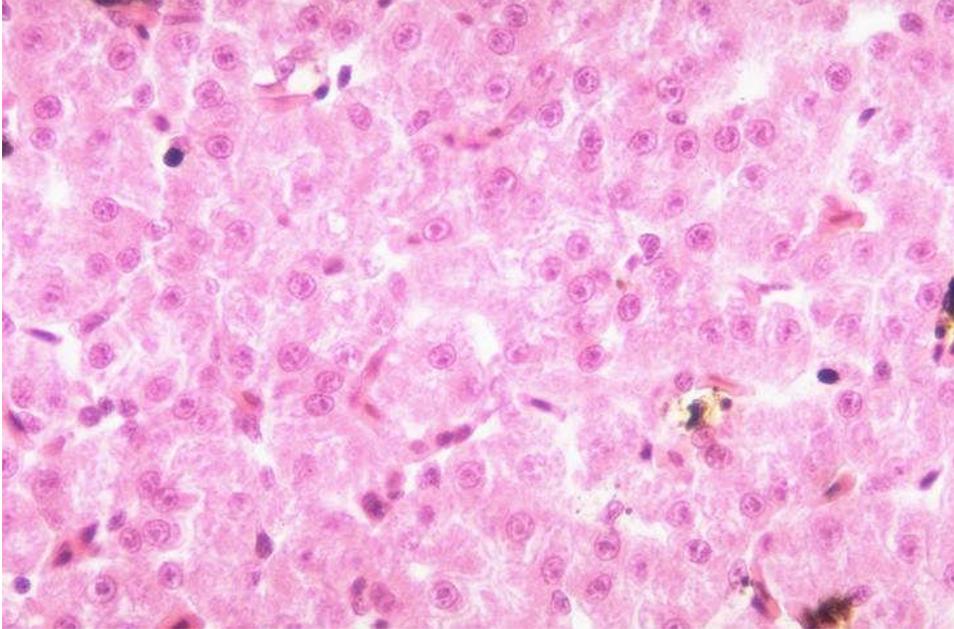


Abb. 55 *Rana temporaria*, Kontrolleber: geringer Glykogengehalt
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

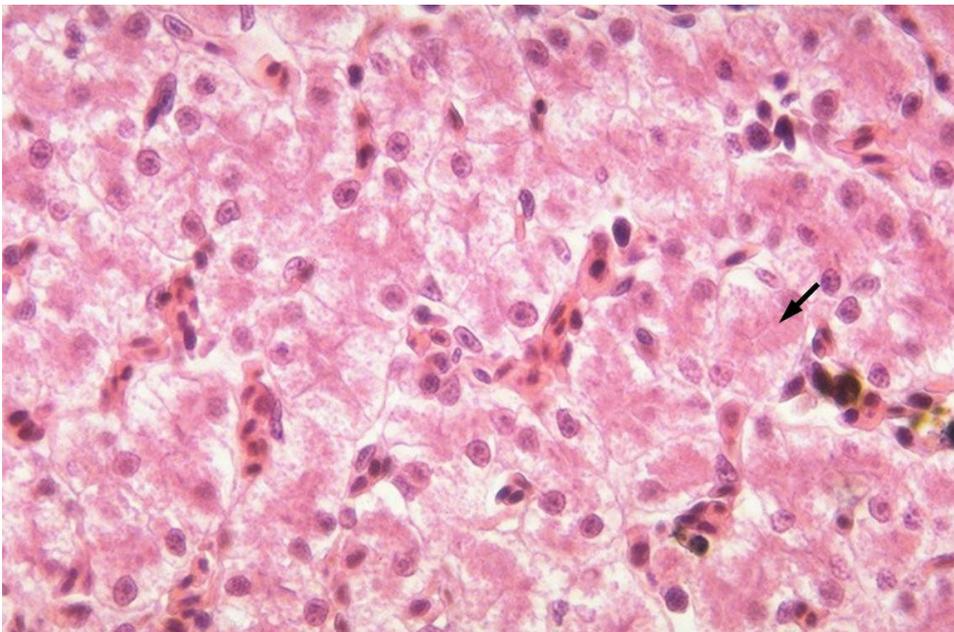


Abb. 56 *Rana temporaria*, Leber: hoher Glykogengehalt
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

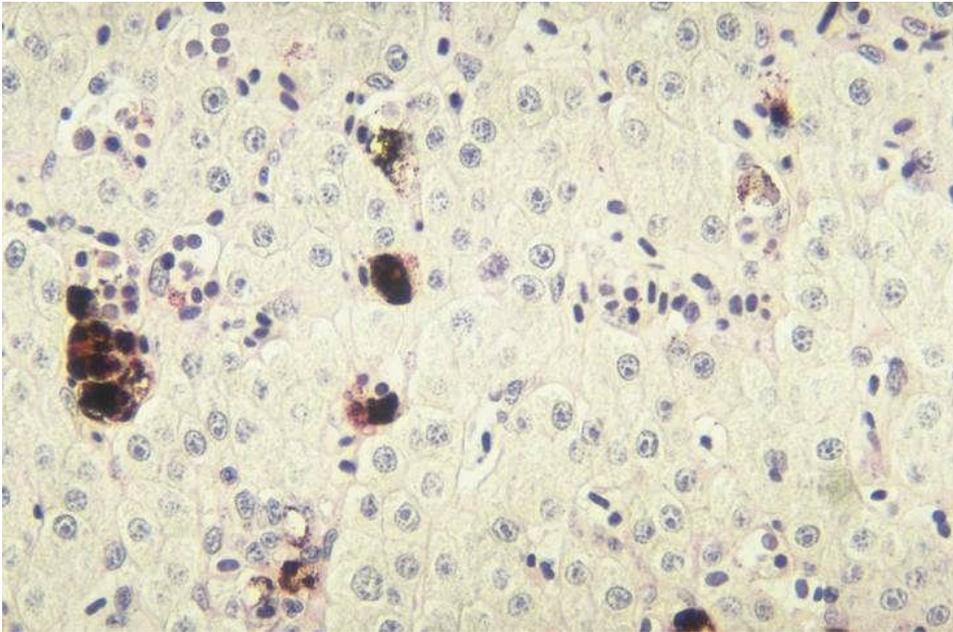


Abb. 57 *Rana temporaria*, Kontrolleber: geringer Glykogengehalt
Färbung: PAS, Primärvergrößerung: 400x

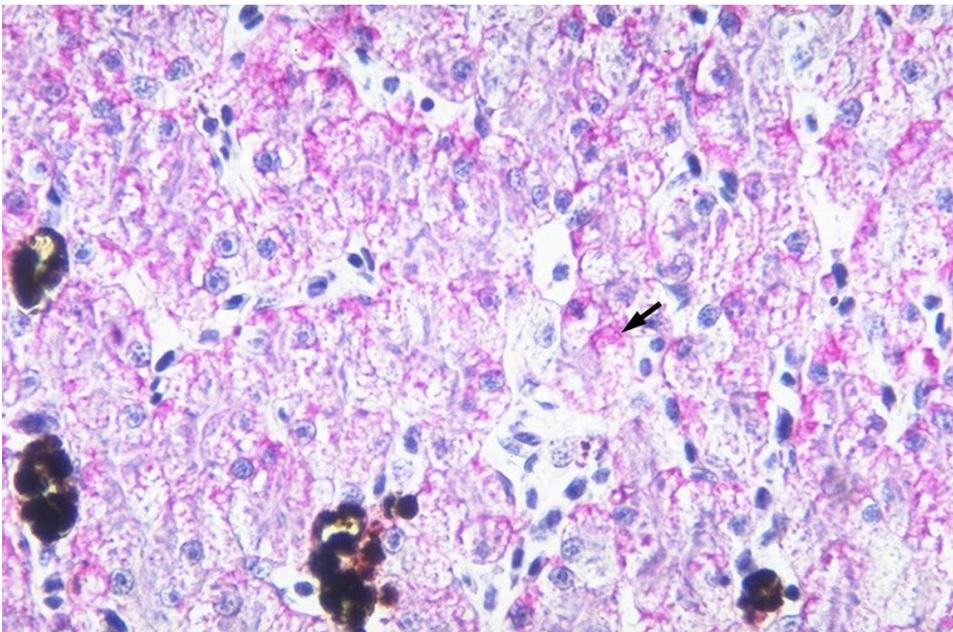


Abb. 58 *Rana temporaria*, Leber: hoher Glykogengehalt
Färbung: PAS, Primärvergrößerung: 400x

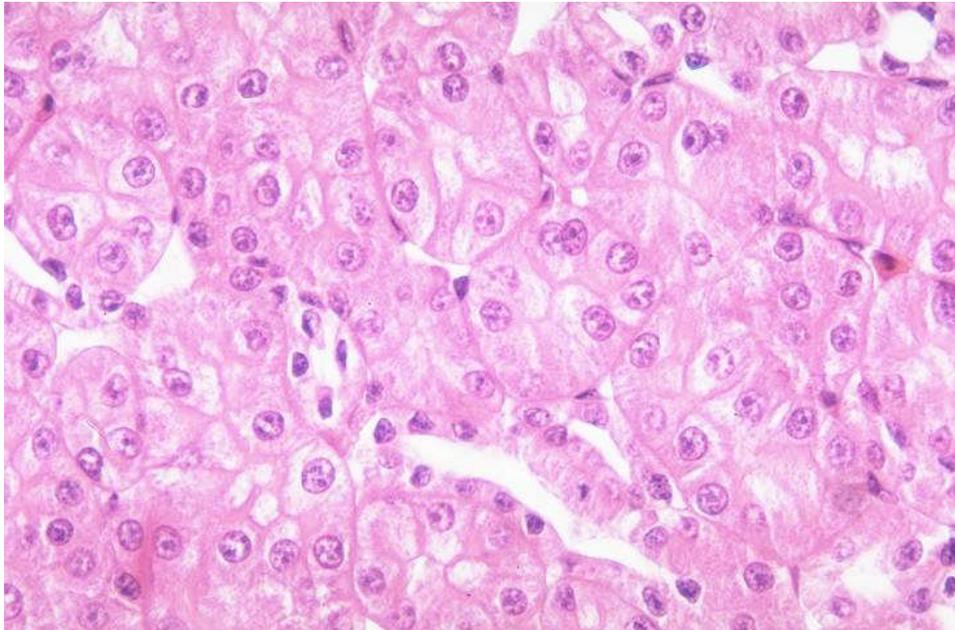


Abb. 59 *Rana temporaria*, Kontrollniere
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

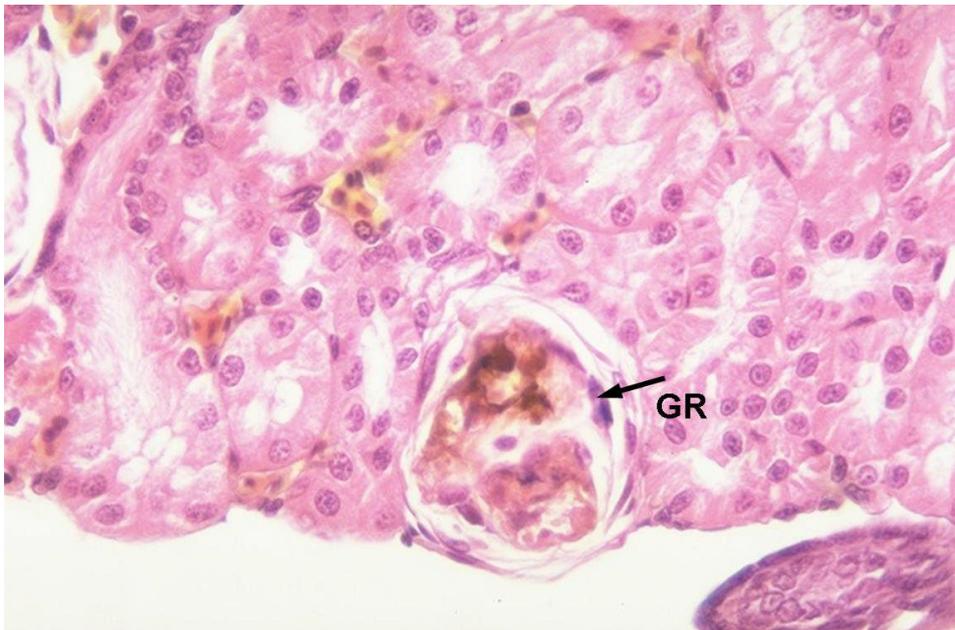


Abb. 60 *Rana temporaria*, Niere: granulomartige Veränderung (GR)
Färbung: HE, Primärvergrößerung: 400x

4.6. Transmissionselektronenmikroskopie von Gonadengewebe

4.6.1. Gruppe I und III (*Rana temporaria*)

Ovar

Das Ovar ist vom Peritonealepithel überzogen (Abb. 61, Abb. 62). Die Epithelzellen stellen sich flach und abgeplattet dar und liegen der Basalmembran, einer zweischichtigen homogenen Grenzstruktur, auf. Das Zytoplasma der Epithelzellen erscheint heller als das der Keimzellen. Organellen lassen sich auch auf ultrastruktureller Ebene nicht deutlich erkennen. Der Zellkern weist eine ungleichmäßig granuliert Struktur auf. Unter dem Peritonealüberzug befindet sich eine Schicht, die vorwiegend aus kollagenen Fasern und lockerem Bindegewebe besteht. Bei den juvenilen Tieren (Abb. 61) erweist sich diese noch als relativ dünn und nur vereinzelt sind kollagene Fibrillen zu erkennen. Die gesamte Interzellularsubstanz wirkt sehr dicht gepackt. Bei den subadulten Tieren (Abb. 62) ist diese Schicht stärker ausgeprägt als bei den Juvenilen, wirkt jedoch wesentlich aufgelockerter. Es sind zahlreiche kollagene Fasern zu erkennen.

Die Oozyten selbst stellen sich als große runde Zellen dar. Sie sind deutlich zu erkennen an ihrem für Keimzellen typischen Zellkern (Abb. 64). Dieser ist sehr groß und gleichmäßig strukturiert und weist eine geringe Elektronendichte auf. In der Frühphase und am Anfang der previtellogenen Phase der Oozytenentwicklung enthält der Kern sehr viele peripher liegende Nukleoli. Das dunklere, fein granuliert Zytoplasma ist deutlich abzugrenzen. Im Zytoplasma der Oozyten finden sich zahlreiche Organellen, vor allem Mitochondrien und rauhes endoplasmatisches Retikulum. Elektronenmikroskopisch lässt sich erkennen, dass die Oozyten sowohl Mitochondrien vom Cristae-Typ als auch vom Tubulus-Typ besitzen (Abb. 65). Die Mitochondrien vom Tubulus-Typ weisen eine lang gestreckte Form auf, wohingegen die Mitochondrien vom Cristae-Typ eine ovale Gestalt zeigen und in größerer Anzahl vorhanden sind. Bei den subadulten Tieren finden sich vereinzelt Kristalle in den Mitochondrien der Oozyten (Abb. 65). Weiterhin weist das Zytoplasma der Oozyten subadulte Tiere in der Peripherie, direkt unterhalb der Plasmamembran, Anhäufungen elektronendichter Granula auf (Abb. 63). Jede Oozyte ist von einer Follikelzellschicht umgeben (Abb. 61, Abb. 62, Abb. 63). Diese liegt bei den juvenilen Tieren dem Oolemm der Eizellen direkt auf und ist relativ schmal. Einzelne Zellgrenzen der Follikelzellen oder Interzellularräume sind nicht zu erkennen. Bei den subadulten Tieren kann man eine deutliche Veränderung feststellen. Es haben sich sowohl von der Oberfläche der Keimzellen als auch von den Follikelzellen aus ineinander greifende Mikrovilli gebildet (Abb. 62). Die Follikelzellen liegen dem Oolemm der Keimzelle nicht mehr direkt auf.

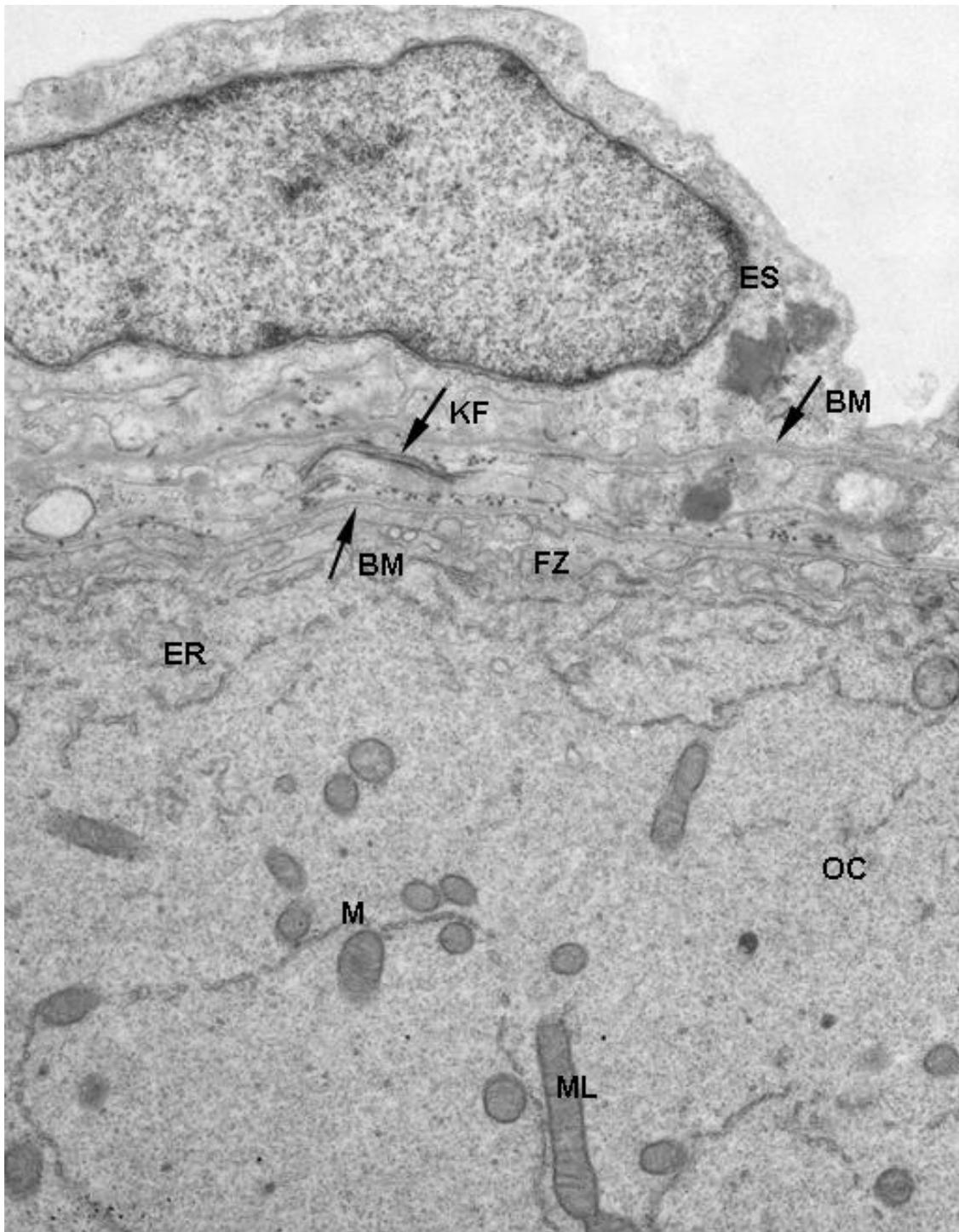


Abb. 61 Ovarialgewebe von *Rana temporaria* (juvenil), 7000x:

Das Ovar wird von einer Epithelschicht (ES) umgeben, welche von einer Basallamina begrenzt (BM) begrenzt wird, die einschichtige flache Follikelzellschicht (FZ) umgibt die Oozyte (OC) und wird ebenfalls von einer BM begrenzt; zwischen ES und FZ finden sich vereinzelt kollagene Fasern (KF); im Zytoplasma der OC finden sich Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum; die lang gestreckten Mitochondrien vom Tubulus-Typ finden sich nur bei weiblichen Keimzellen.

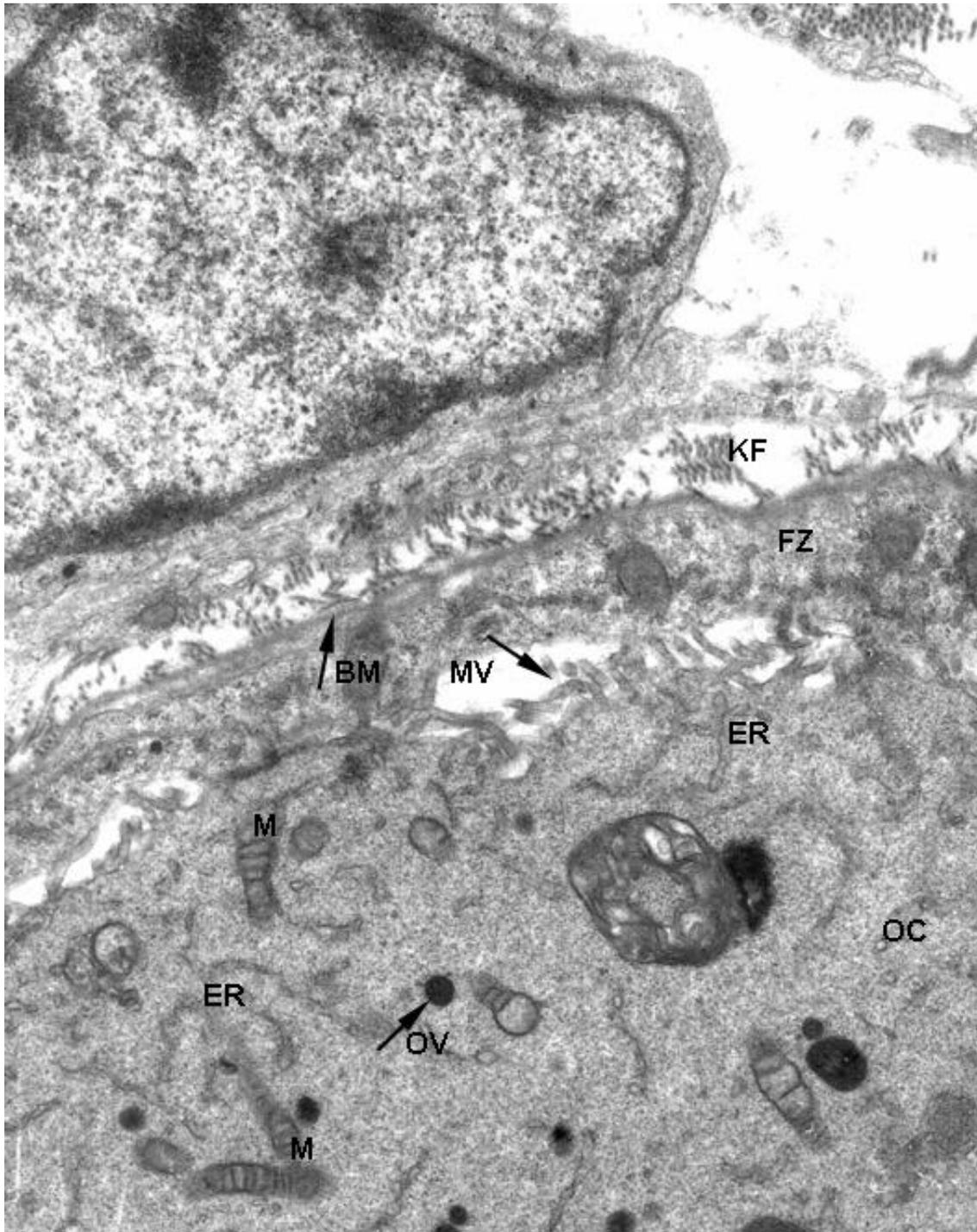


Abb. 62 Ovarialgewebe von *Rana temporaria* (subadult), 7000x:

Zwischen der Follikelzellschicht (FZ) und dem Oolemm der Oozyte (OC) haben sich Mikrovilli (MV) ausgebildet; im Zytoplasma der Oozyte finden sich Mitochondrien (M), endoplasmatisches Retikulum (ER) und osmophile Vesikel (OV).

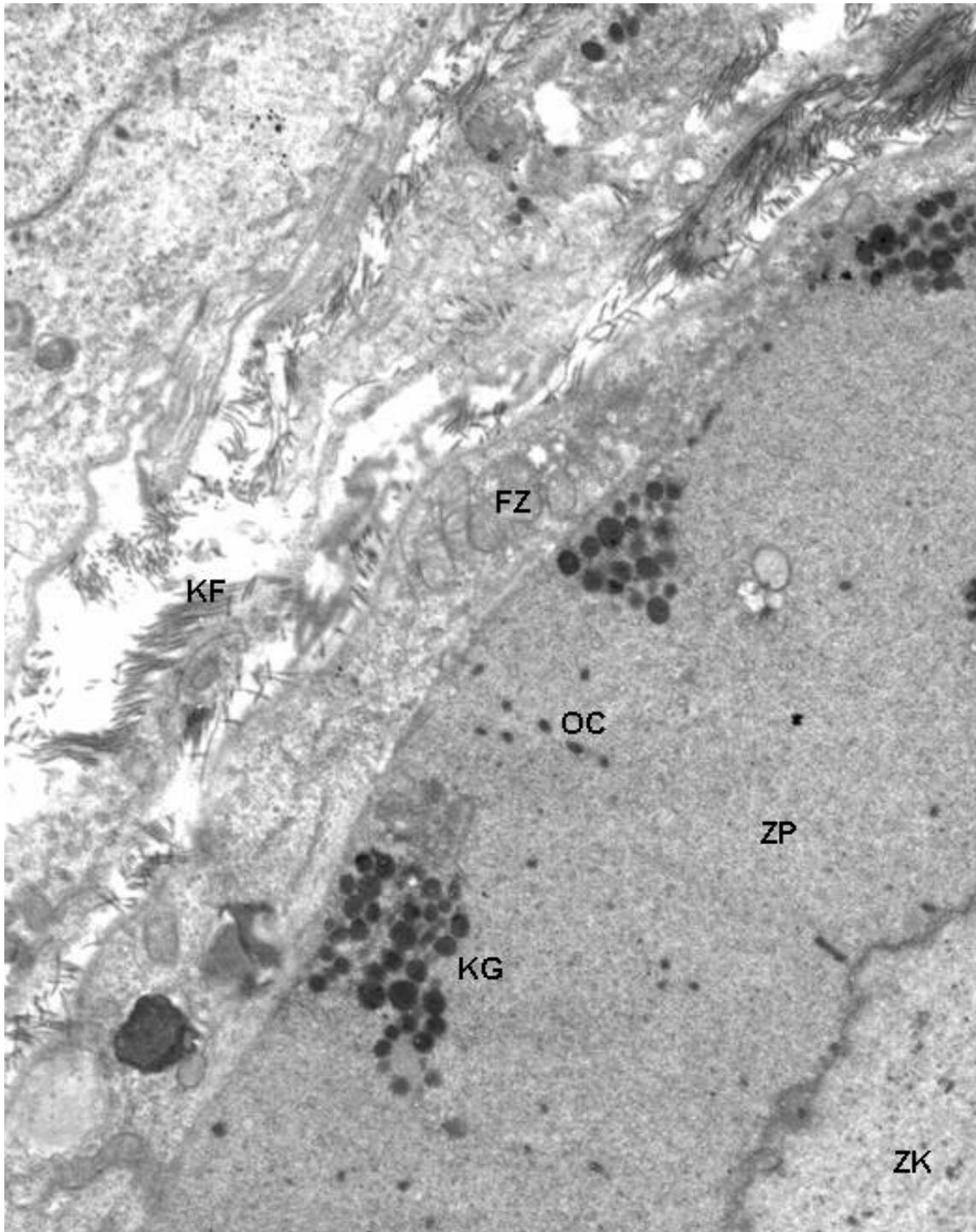


Abb. 63 Ovarialgewebe von *Rana temporaria* (subadult), 4400x:

Oozyte (OC) mit typischem hellen Zellkern (ZK); im Zytoplasma finden sich direkt unterhalb der Plasmamembran elektronendichten Kortikalgranula (KG); Follikelzellschicht (FZ), kollagene Fasern (KF)

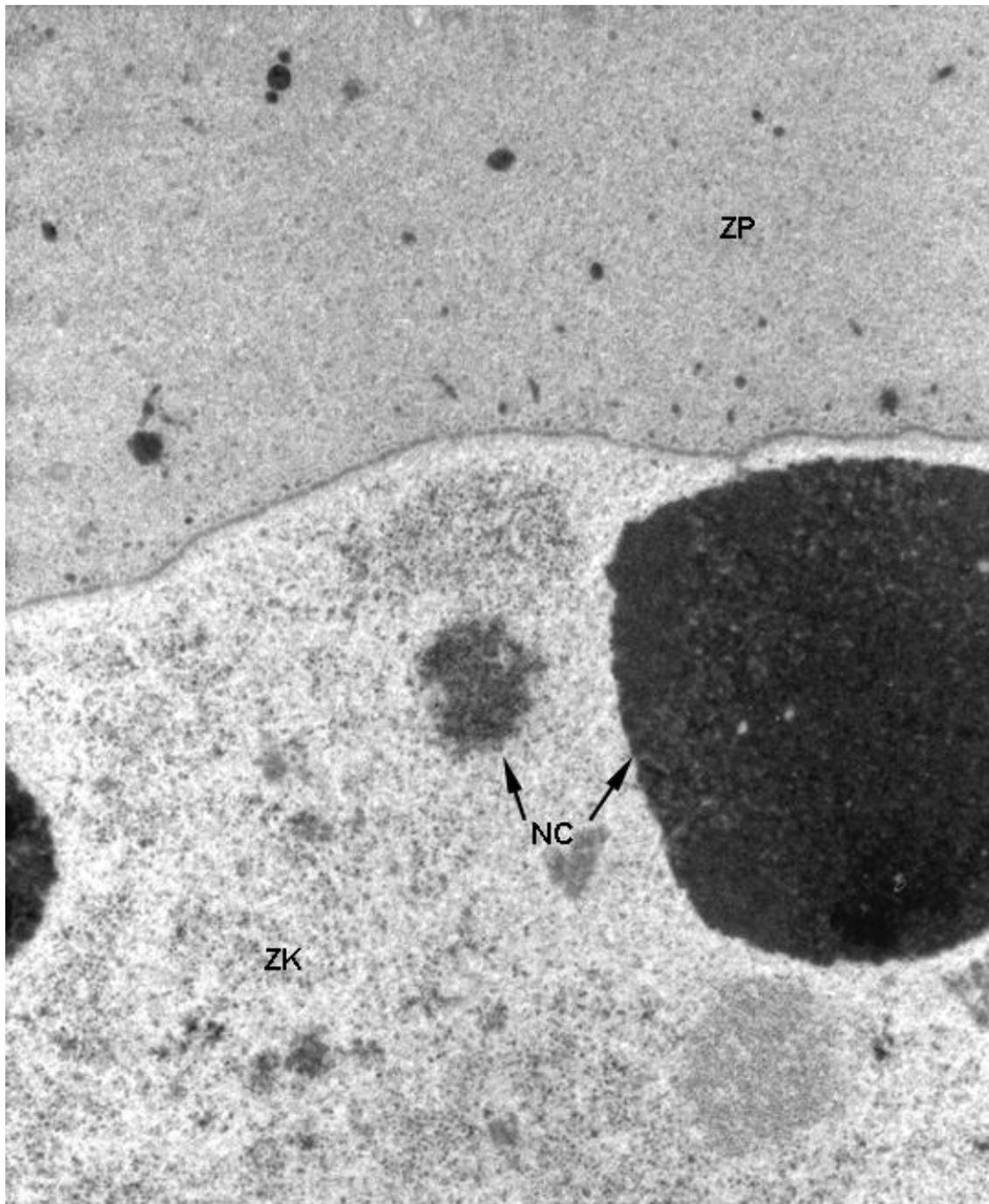


Abb. 64 Ovarialgewebe von *Rana temporaria* (subadult), 4400x:
Oozyte mit einem hellen, fein strukturierten Zellkern (ZK) und peripher liegenden
Nukleoli (NC), Zytoplasma (ZP) der Oozyte

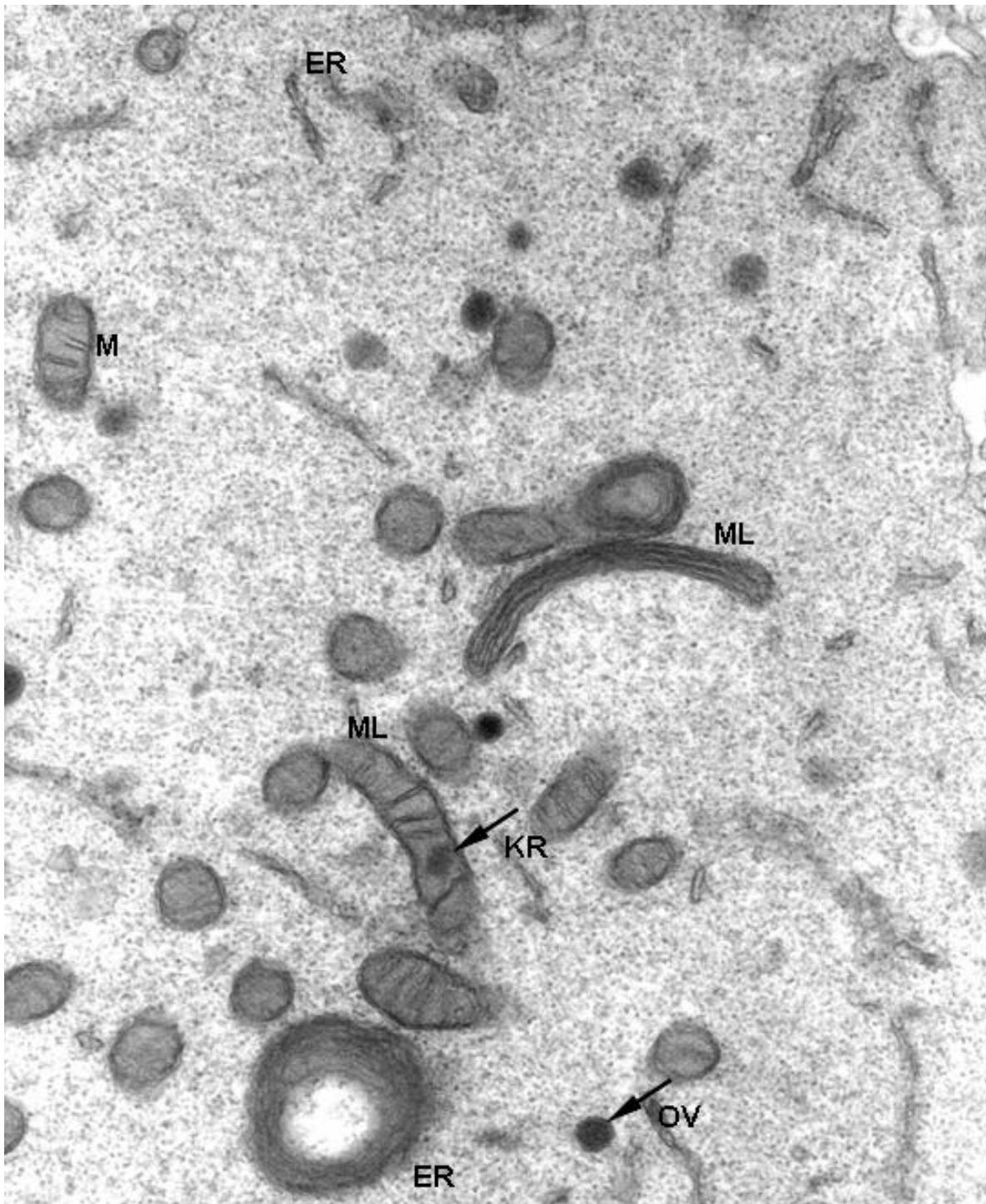


Abb. 65 Ovarialgewebe von *Rana temporaria* (subadult), 120000x:
Zytoplasma einer Oozyte mit zahlreichen Mitochondrien (M) und endoplasmatischem
Retikulum (ER); Kristall (KR) in einem Mitochondrium; lang gestreckte Mitochondrien (ML)
vom tubulären Typ, osmophile Vesikel (OV)

Hoden

Die zweischichtige Umhüllung des Hodens gliedert sich in das Peritonealepithel und die darunter liegende Tunica albuginea, die hauptsächlich aus straffem Bindegewebe besteht (Abb. 66). Beide Schichten sind jeweils durch eine durchgehende Basallamina voneinander getrennt. Zwischen diesen Schichten befinden sich kollagene Fasern. Bei den Hoden der subadulten Tiere finden sich in diesem Interzellularraum außerdem Pigmenteinlagerungen. Die Hoden der Amphibien besitzen ebenso wie die Hoden der Säugetiere Samenkanälchen, Tubuli seminiferi, die in ein Gerüst aus Bindegewebe eingebettet sind. Die Tubuli seminiferi werden von einer Lamina propria umgeben. Sie sind vom benachbarten lockeren Bindegewebe durch eine durchgehende Basalmembran getrennt. Das Epithel der Tubuli seminiferi wird von Keimzellen und somatischen Zellen gebildet. Schon die histologische Untersuchung ergab bei den juvenilen und bei den subadulten Grasfröschen ausschließlich Spermatogonien, Spermatozyten waren noch nicht nachweisbar. Auf ultrastruktureller Ebene sind die Keimzellen gekennzeichnet durch einen hellen, gleichmäßig strukturierten Zellkern, der eine unregelmäßige Form aufweist (Abb. 67, Abb. 68, Abb. 69). Im Zytoplasma der Keimzellen finden sich zahlreiche Organellen (Abb. 67). Die somatischen Zellen, die sich innerhalb der Tubuli seminiferi befinden, sind durch einen dunklen, oft halbmondförmigen Kern gekennzeichnet. Sie besitzen nur einen schmalen Zytoplasmasaum mit einem schwach entwickelten endoplasmatischen System und wenigen Mitochondrien. Sowohl die somatischen Zellen innerhalb der Tubuli als auch die Keimzellen weisen Desmosomen innerhalb der Zellmembran auf (Abb. 67). Leydig'sche Zwischenzellen kommen nur vereinzelt in kleinen Ansammlungen im Interstitium vor (Abb. 70). Der Zellkern dieser Zellen ist, ebenso wie der der somatischen Zellen innerhalb der Tubuli, dunkel und unregelmäßig strukturiert, der Zytoplasmasaum ist jedoch wesentlich breiter. Auffälligstes Charakteristikum der Leydig'schen Zwischenzellen sind die Granularvesikel im Zytoplasma. Diese unterscheiden sich in ihrer Elektronendichte. Der größte Teil der Vesikel enthält einen stark elektronendichten Inhalt, andere weisen einen gekörnnten Inhalt und eine schwache Elektronendichte auf. Letztere sind zum Teil von einer lamellären Substruktur durchsetzt. Vereinzelt finden sich Lipidtröpfchen im Zytoplasma.

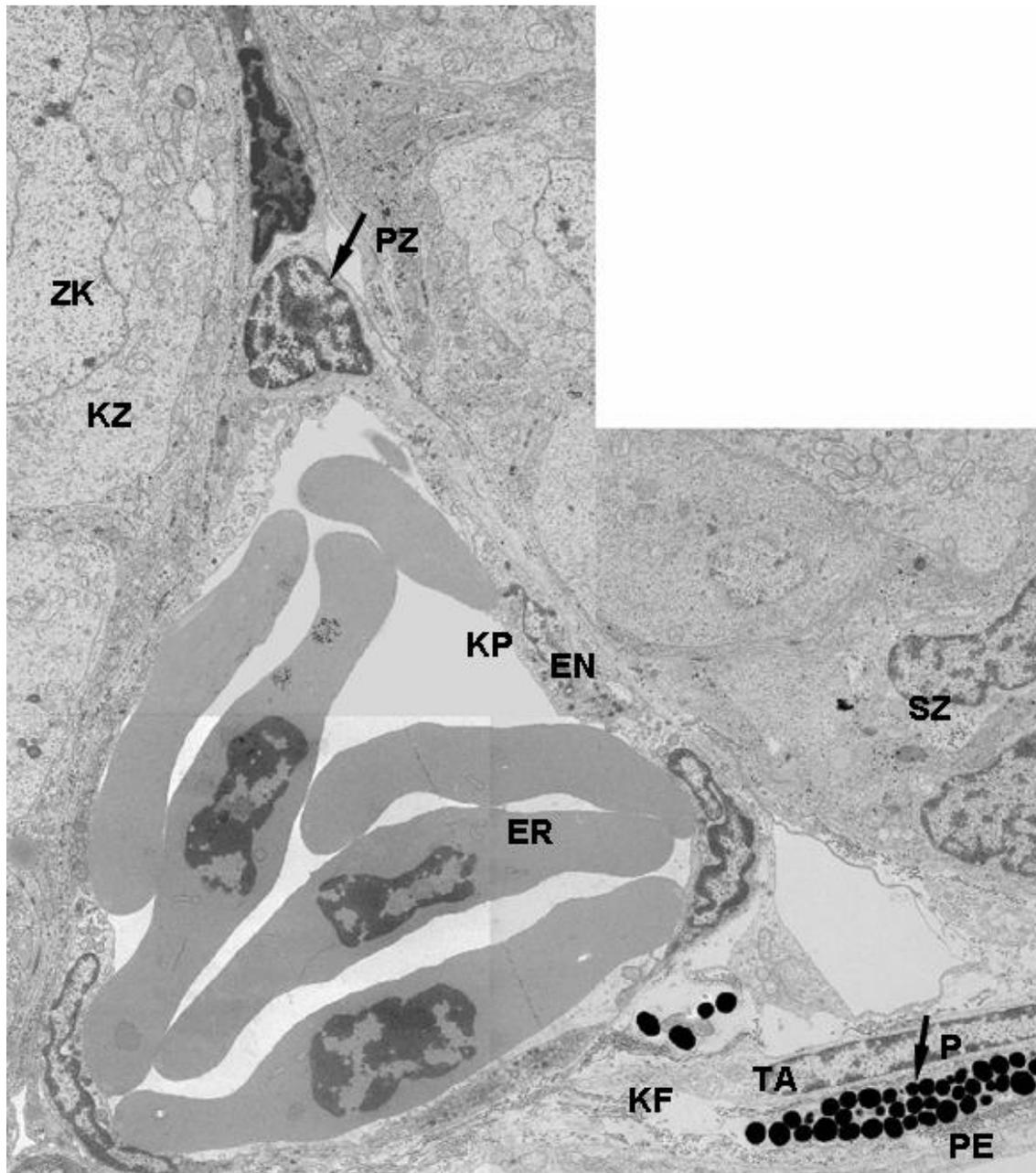


Abb. 66 Hodengewebe von *Rana temporaria* (subadult), 3000x:

[zusammengesetztes Bild]

Kapillare (KP) mit umgebenden Endothelzellen (EN) und Perizyt (PZ); Peritoneal-epithel (PE) und Tunica albuginea (TA) umschließen den Hoden; zwischen PE und TA finden sich zahlreiche Pigmenteinlagerungen (P) und kollagene Fasern (KF), Keimzellen (KZ) und somatische Zellen (SZ) mit typischen Zellkernen (ZK);

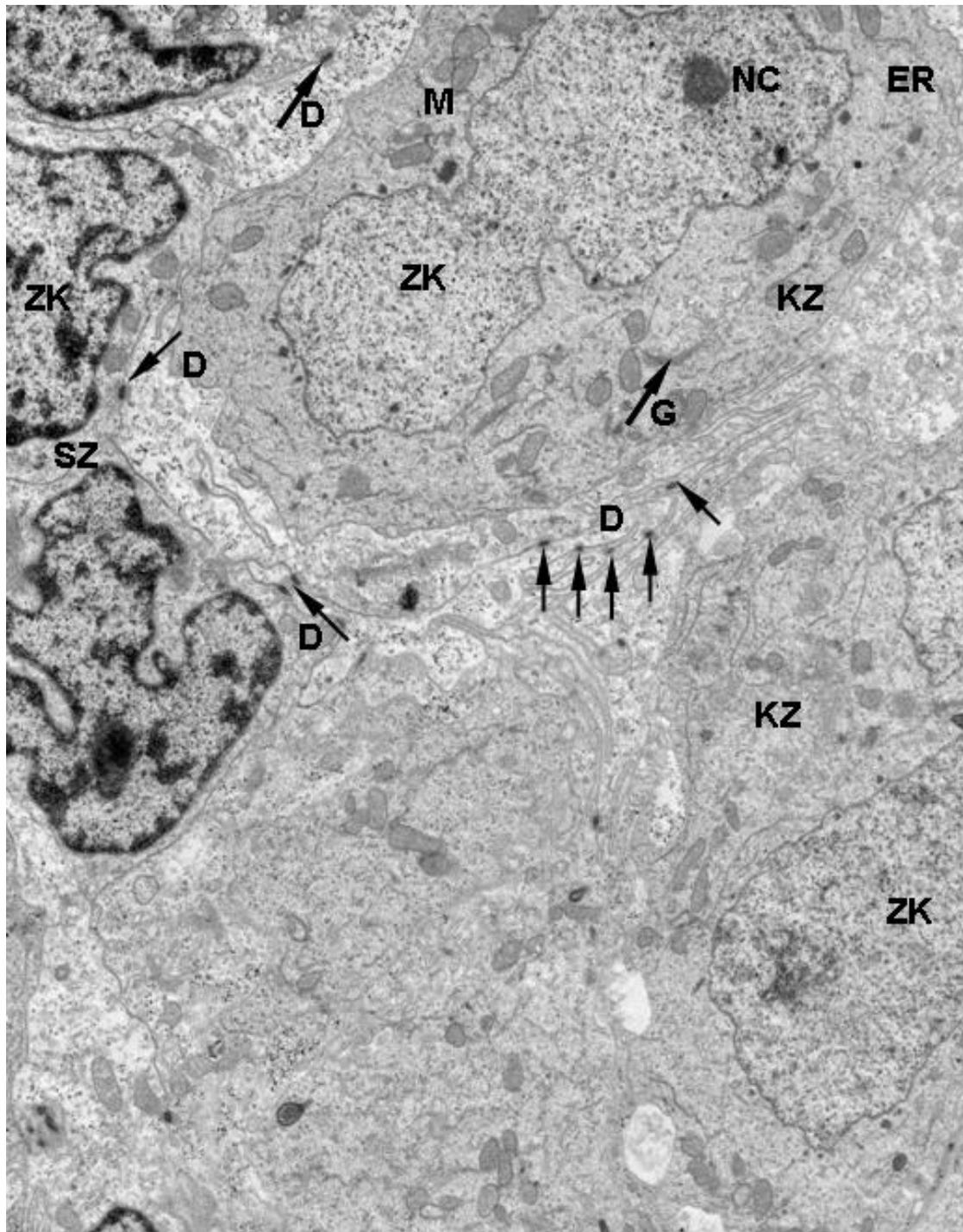


Abb. 67 Hodengewebe von *Rana temporaria* (juvenil), 3000x:
Keimzellen (KZ) und somatische Zellen (SZ) mit typischen Zellkernen (ZK); im Zytoplasma der KZ finden sich zahlreiche Organellen: Mitochondrien (M), endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat (G); an der Zellmembran von SZ und KZ finden sich Desmosomen (D)

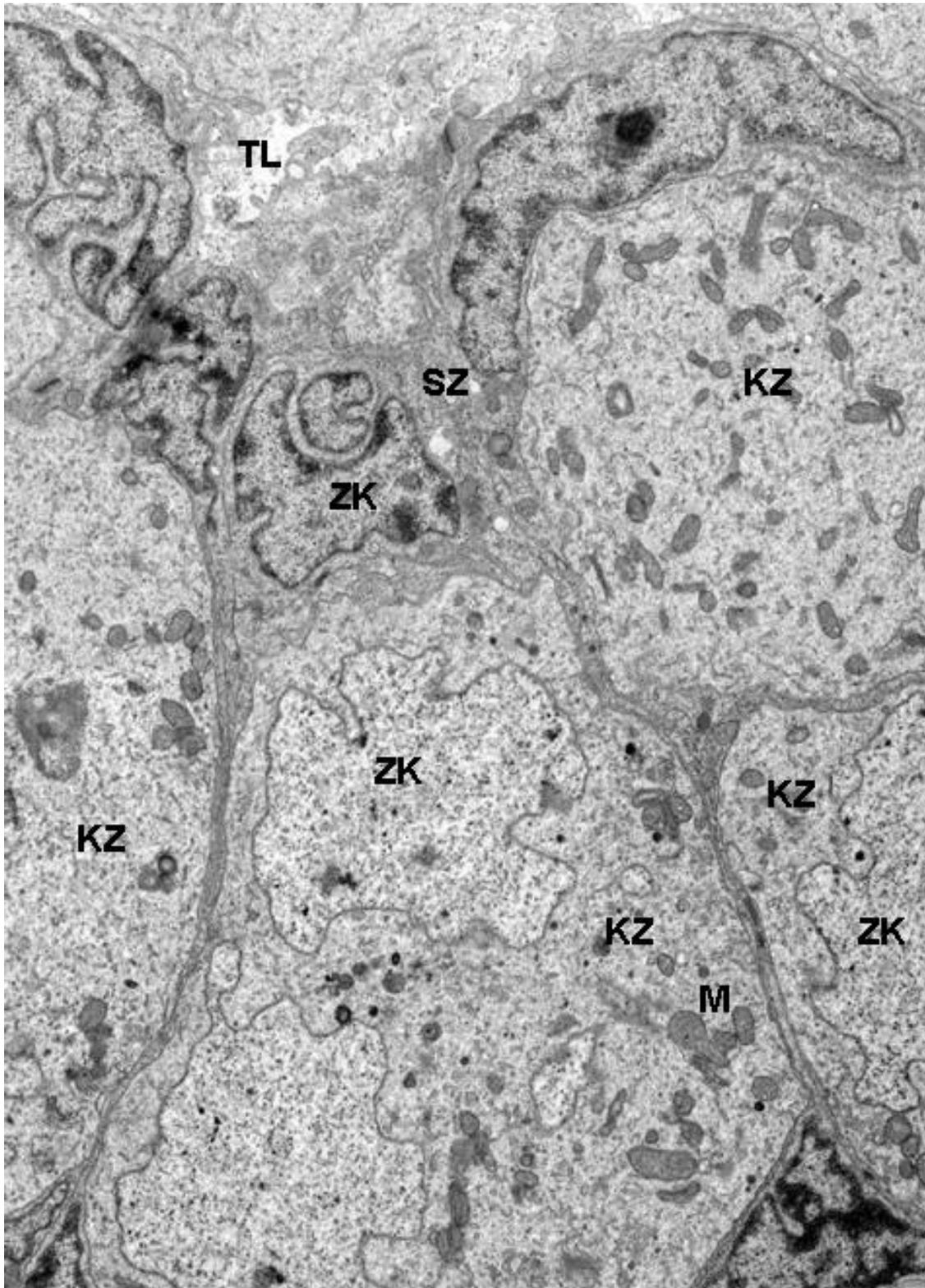


Abb. 68 Hodengewebe von *Rana temporaria* (subadult), 3000x:
somatische Zellen (SZ) drängen Keimzellen (KZ) an den basalen Rand des
Tubulus; Tubuluslumen (TL); Mitochondrien (M)

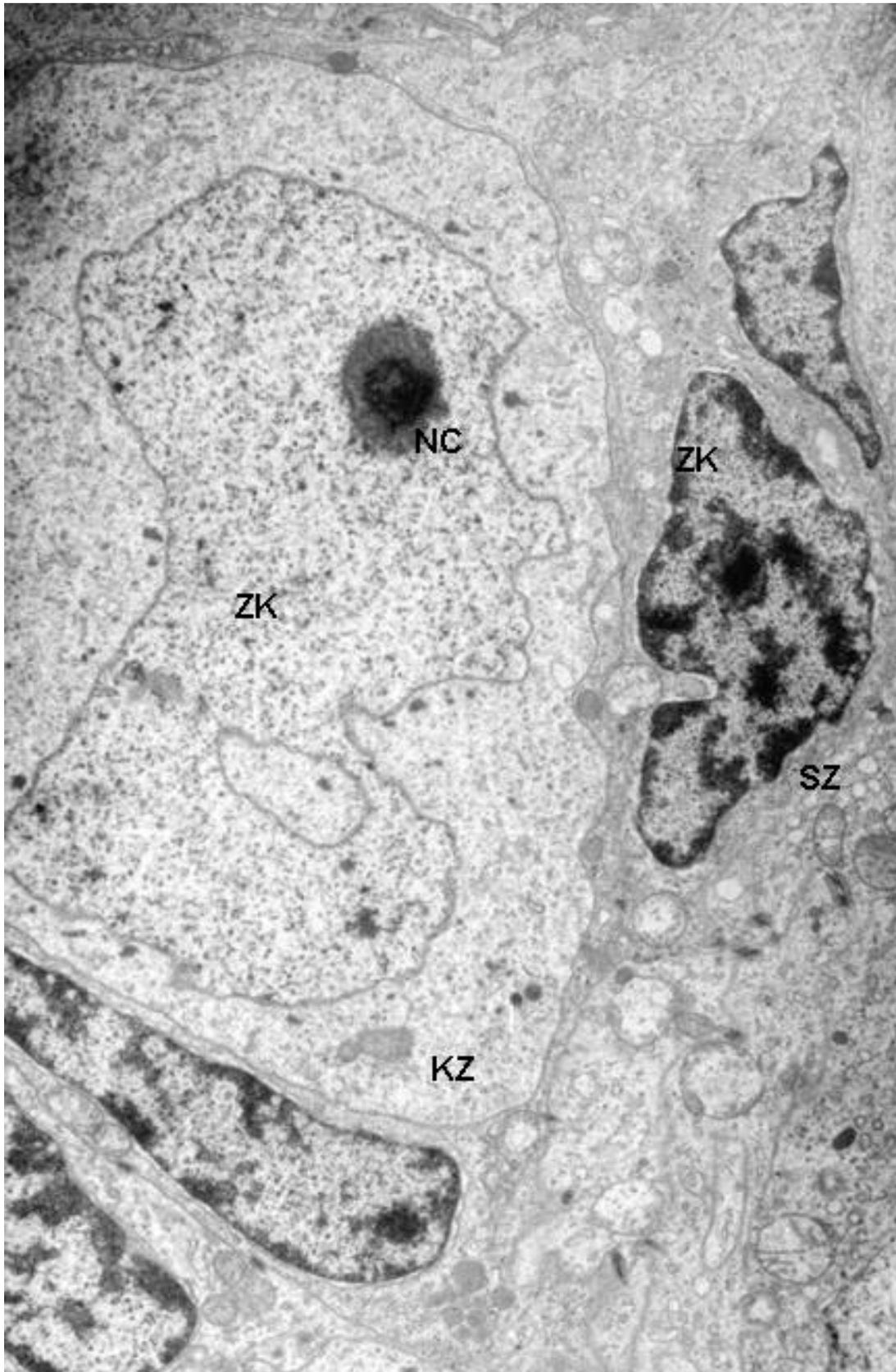


Abb. 69 Hodengewebe von *Rana temporaria* (subadult), 4400x:
Keimzellen (KZ) mit gleichmäßig strukturiertem Zellkern (ZK) und Nukleolus (NC) und somatische Zellen (SZ) mit dunklem Zellkern

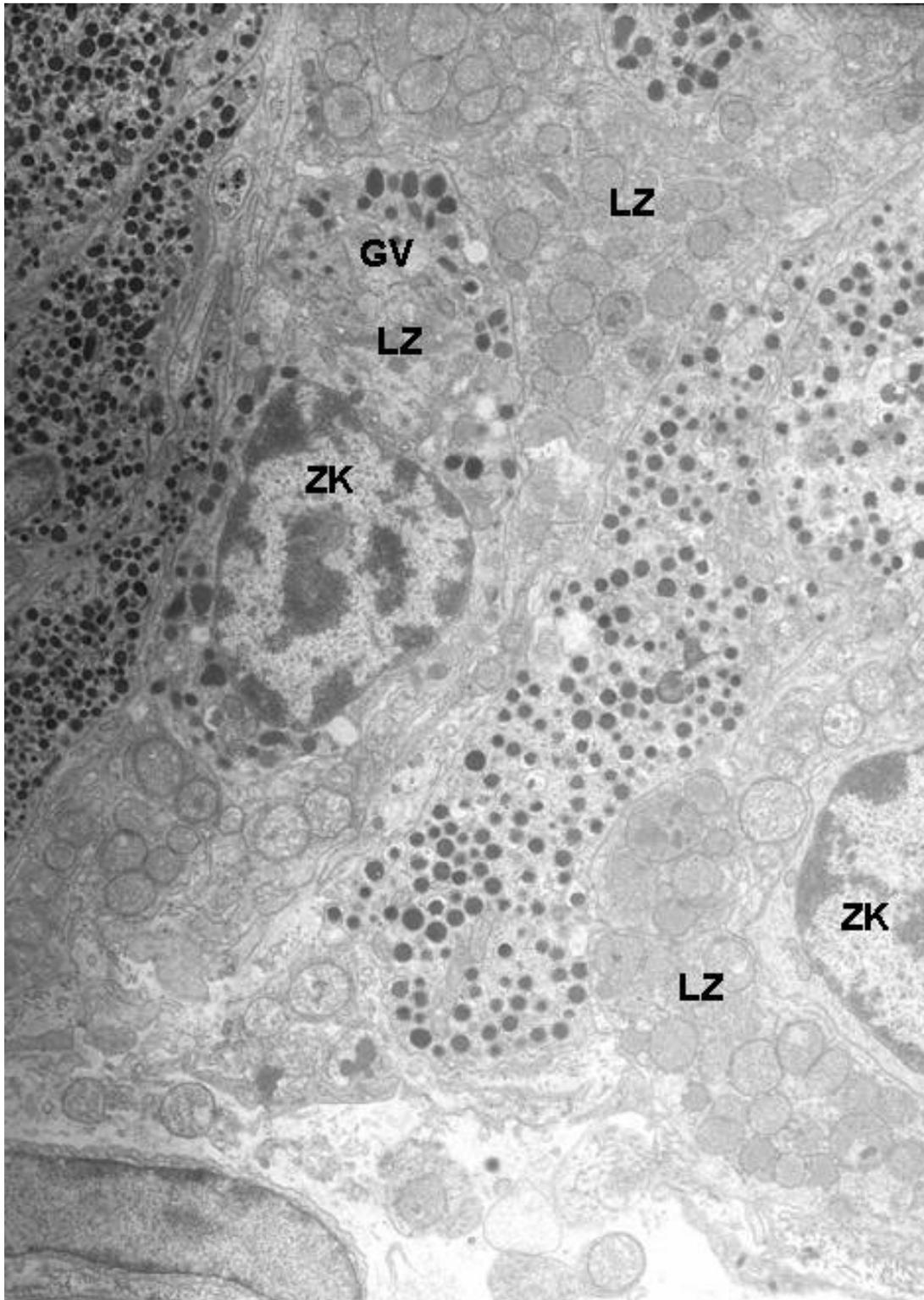


Abb. 70 Hodengewebe von *Rana temporaria* (juvenil), 3000x:
Leydig'sche Zwischenzellen (LZ) mit Granularvesikeln (GV) im Zytoplasma, Zell-
kern (ZK)

4.7. Immunhistochemie an Gonadengewebe

4.7.1. Laminin

Die immunhistochemische Reaktion von Lamininantikörpern mit dem Gonadengewebe von *Rana temporaria* fiel in einigen Bereichen schwach bis deutlich positiv aus (Tab. 24) (Abb. 71, Abb. 72).

Das Außenepithel der Ovarien aller weiblichen Frösche reagierte schwach positiv (Abb. 71), wohingegen das Außenepithel des Hodens (Abb. 72) des einzigen männlichen Individuums und der Gonade eines Hermaphroditen im Transformationsstadium II eine deutlich positive Reaktion zeigte. In der Regel wiesen die Gefäßwände, das Tubulusepithel des Hodengewebes und die Follikelzellschicht der Ovarien eine schwach positive Reaktion mit dem Lamininantikörper auf. Bei drei Tieren reagierte das Zytoplasma der Oozyten schwach positiv.

Tab. 24 Immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Nr.	Geschlecht	AEpi	Gef	OG		OC		FZ	SZ	SP	TuEpi
				Ool	Zytop	Ool	Zytop				
1	M	++	+	/	/	/	/	/	-	-	+
2	W	+	+	-	-	-	-	+	/	/	/
3	HA I	+	+	-	-	-	-	+	/	/	/
4	W	+	+	-	-	-	-	+	/	/	/
5	W	+	+	-	-	-	-	+	/	/	/
6	W	+	+	-	-	-	-	+	/	/	/
7	W	+	+	-	-	-	+	+	/	/	/
8	W	+	+	-	-	-	-	+	/	/	/
9	W	+	+	-	-	-	+	+	/	/	/
10	HA I	+	+	-	-	-	-	+	/	/	/
11	W	+	+	-	-	-	-	+	/	/	/
12	HA I	+	+	-	-	-	-	+	/	/	/
13	HA II	++	+	-	-	-	-	+	/	-	/
14	HA I	+	/	-	-	-	+	+	/	/	/

AEpi: Außenepithel, Gef: Gefäße, OG: Oogonium, Ool: Oolemm,

Zytop: Zytoplasma, OC: Oocyte, FZ: Follikelzellschicht, SZ: somatische Zellen,

Mes: Mesenchym, SP: Spermatogonium, TuEpi: Tubulusepithel

Immunhistochemische Reaktion: -: negativ, +: schwach positiv, ++: deutlich positiv, +++: stark positiv,

/: im Präparat nicht vorhanden

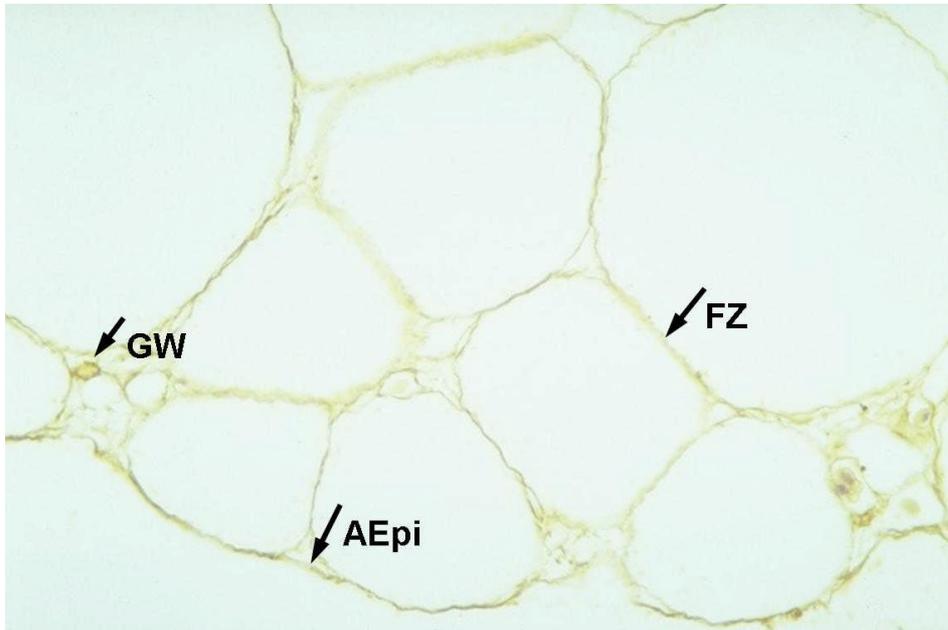


Abb. 71 *Rana temporaria* (Nr.5), weiblich

Immunhistochemischer Nachweis: Laminin, Primärvergrößerung: 400x
Gefäßwand (GW), Außenepithel (AEpi), Follikelzellschicht (FZ)

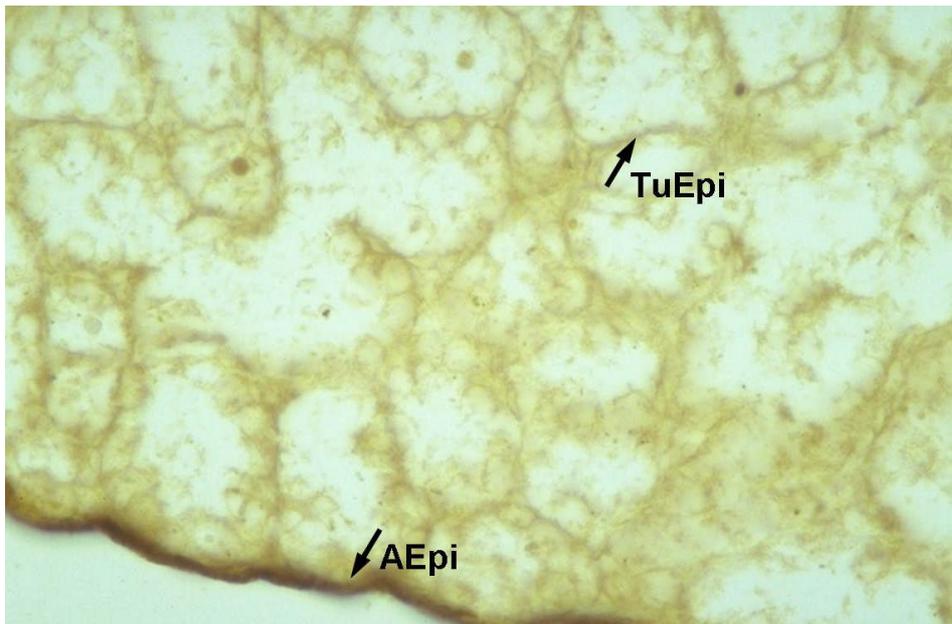


Abb. 72 *Rana temporaria* (Nr.1), männlich

Immunhistochemischer Nachweis: Laminin, Primärvergrößerung: 400x
Außenepithel (AEpi), Tubulusepithel (TuEpi)

4.7.2. SMA (Smooth Muscle Actin)

Mit dem Smooth Muscle Actin-Antikörper zeigten ausschließlich die Gefäßwände aller untersuchten Präparate eine deutlich positive Reaktion (Abb. 73, Abb. 74). Alle weiteren untersuchten Strukturen wiesen keine Reaktion mit dem SMA-Antikörper auf.

Tab. 25 Immunhistochemischer Nachweis von SMA

Nr.	Geschlecht	AEpi	Gef	OG		OC		FZ	SZ	SP	TuEpi
				Ool	Zytop	Ool	Zytop				
1	M	-	++	/	/	/	/	/	-	-	-
2	W	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
3	HA I	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
4	W	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
5	W	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
6	W	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
7	W	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
8	W	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
9	W	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
10	HA I	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
11	W	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
12	HA I	-	++	-	-	-	-	-	/	/	/
13	HA II	-	++	-	-	-	-	-	/	-	/
14	HA I	/	/	-	-	-	-	-	/	/	/

AEpi: Außenepithel, Gef: Gefäße, OG: Oogonium, Ool: Oolemm,

Zytop: Zytoplasma, OC: Oocyte, FZ: Follizellschicht, SZ: somatische Zellen,

Mes: Mesenchym, SP: Spermatogonium, TuEpi: Tubulusepithel

Immunhistochemische Reaktion: -: negativ, +: schwach positiv, ++: deutlich positiv, +++: stark positiv,

/ :im Präparat nicht vorhanden



Abb. 73 *Rana temporaria* (Nr.8), weiblich

Immunhistochemischer Nachweis von SMA in der Gefäßwand (GW)

Primärvergrößerung: 400x

Oozyten (OC), Follikelzellen (FZ)

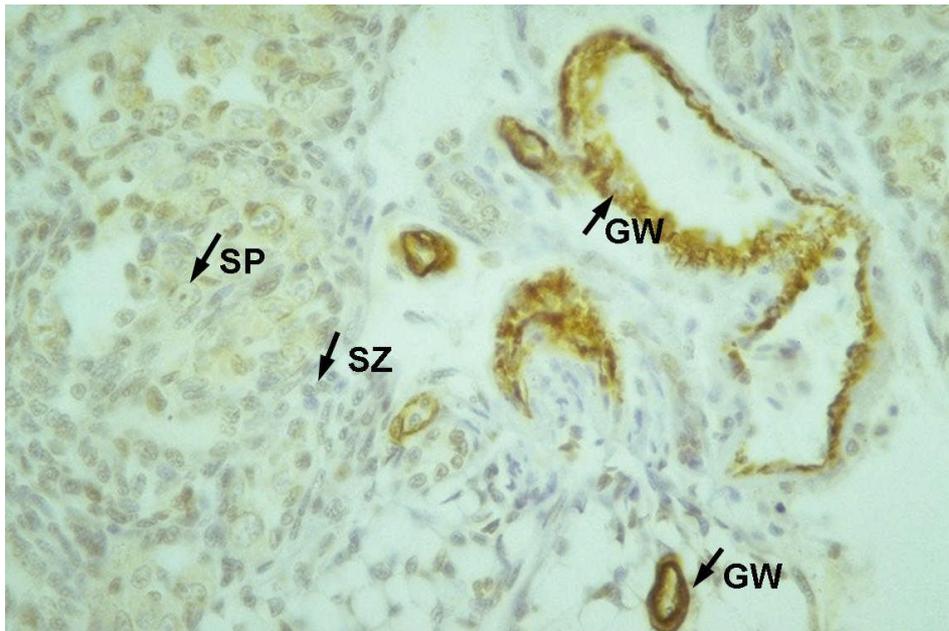


Abb. 74 *Rana temporaria* (Nr.1), männlich

Immunhistochemischer Nachweis von SMA in der Gefäßwand (GW)

Primärvergrößerung: 400x

Spermatogonien (SP), somatische Zellen (SZ)

4.7.3. ZP3• und ZP3•

Der immunhistochemische Nachweis der Glykoproteine ZP3• und ZP3• fiel in der Regel negativ aus (Abb. 75, Abb. 76). Lediglich das Außenepithel einiger Gonaden sowohl bei männlichen und weiblichen als auch bei hermaphroditischen Tieren reagierte schwach positiv (Tab. 26, Tab. 27).

Tab. 26 Immunhistochemischer Nachweis von ZP3•

Nr.	Geschlecht	AEpi	Gef	OG		OC		FZ	SZ	SP	TuEpi
				Ool	Zytop	Ool	Zytop				
1	M	+	-	/	/	/	/	/	-	-	-
2	W	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
3	HA I	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
4	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
5	W	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
6	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
7	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
8	W	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
9	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
10	HA I	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
11	W	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
12	HA I	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
13	HA II	+	-	-	-	-	-	-	/	-	/
14	HA I	-	/	-	-	-	-	-	/	/	/

AEpi: Außenepithel, Gef: Gefäße, OG: Oogonium, Ool: Oolemm,

Zytop: Zytoplasma, OC: Oozyte, FZ: Follikelzellschicht, SZ: somatische Zellen,

Mes: Mesenchym, SP: Spermatogonium, TuEpi: Tubulusepithel

Immunhistochemische Reaktion: -: negativ, +: schwach positiv, ++: deutlich positiv, +++: stark positiv,

/ :im Präparat nicht vorhanden

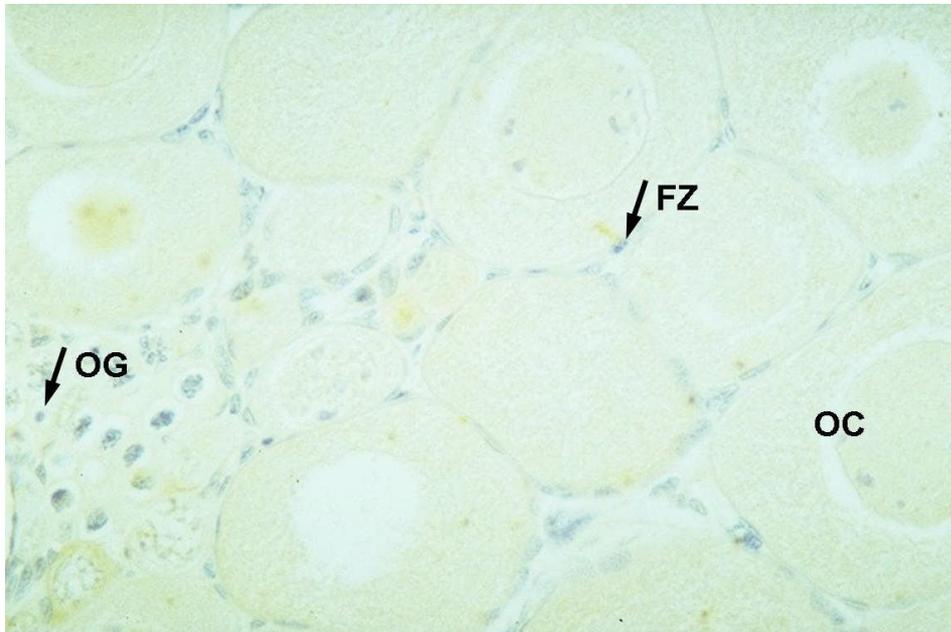


Abb. 75 *Rana temporaria* (Nr. 10), Hermaphrodit I

Immunohistochemischer Nachweis von ZP3•, Primärvergrößerung: 400x
Oozyten (OC), Follikelzellen (FZ), Oogonien (OG)

Tab. 27 Immunohistochemischer Nachweis von ZP3•

Nr.	Geschlecht	AEpi	Gef	OG		OC		FZ	SZ	SP	TuEpi
				Ool	Zytop	Ool	Zytop				
1	M	+	-	/	/	/	/	/	-	-	-
2	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
3	HA I	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
4	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
5	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
6	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
7	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
8	W	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
9	W	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
10	HA I	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
11	W	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
12	HA I	+	-	-	-	-	-	-	/	/	/
13	HA II	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/
14	HA I	-	/	-	-	-	-	-	/	/	/

AEpi: Außenepithel, Gef: Gefäße, OG: Oogonium, Ool: Oolemm,

Zytop: Zytoplasma, OC: Oocyte, FZ: Follikelzellschicht, SZ: somatische Zellen,

Mes: Mesenchym, SP: Spermatogonium, TuEpi: Tubulusepithel

Immunohistochemische Reaktion: - : negativ, + : schwach positiv, ++ : deutlich positiv, +++ : stark positiv,

/ : im Präparat nicht vorhanden

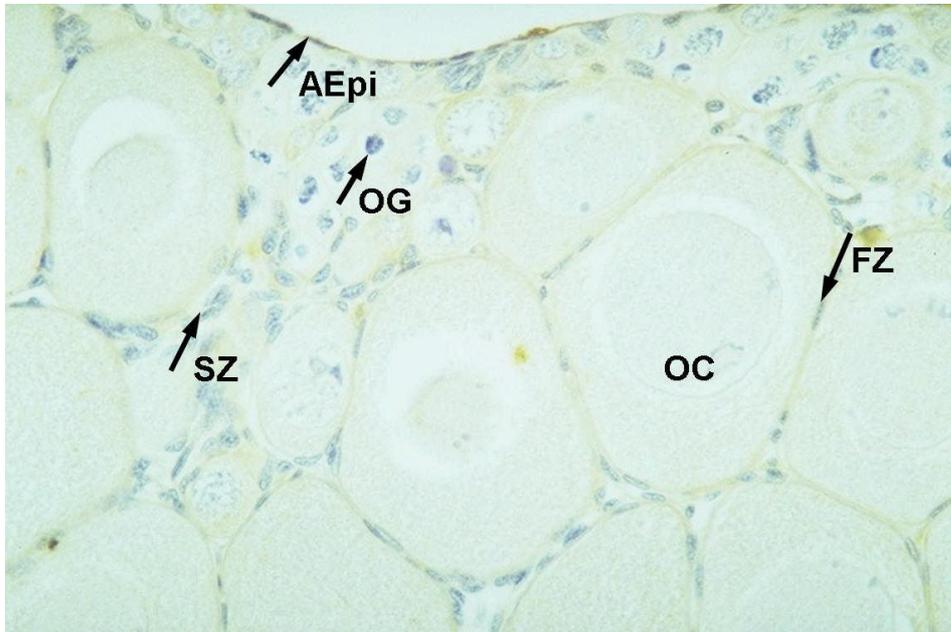


Abb. 76 *Rana temporaria* (Nr. 10), Hermaphrodit I

Immunhistochemischer Nachweis von ZP3• im Außenepithel (AEpi)

Primärvergrößerung: 400x

Oozyten (OC), Follikelzellen (FZ), Oogonien (OG), somatische Zellen (SZ)

4.7.4. ACE (Angiotensin Converting Enzyme)

Im Rahmen des immunhistochemischen Nachweises des Angiotensin Converting Enzyms reagierte bei dem einzigen untersuchten männlichen Tier nur das Außenepithel deutlich positiv (Abb. 77). Sowohl die Spermatogonien als auch alle anderen Gewebe zeigten eine negative Reaktion. Ein Hermaphrodit im Stadium II (Nr.13) zeigte eine schwach positive Reaktion im Bereich des Außenepithels und der bereits in Degeneration befindlichen Oozyten (Abb. 78). Bei den weiblichen Tieren und einem Hermaphroditen im Stadium I war ebenfalls eine schwach positive Reaktion des Außenepithels sowie des Zytoplasmas der Oozyten (Abb. 79) nachweisbar. Weitere untersuchte Strukturen ließen keine immunhistochemische Reaktion erkennen.

Tab. 28 Immunhistochemischer Nachweis von ACE

Nr.	Geschlecht	AEpi	Gef	OG		OC		FZ	SZ	SP	TuEpi
				Ool	Zytop	Ool	Zytop				
1	M	++	-	/	/	/	/	/	-	-	-
2	W	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
3	HA I	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
4	W	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
5	W	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
6	W	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
7	W	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
8	W	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
9	W	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
10	HA I	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
11	W	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
12	HA I	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/
13	HA II	+	-	-	-	-	+	-	/	-	/
14	HA I	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/

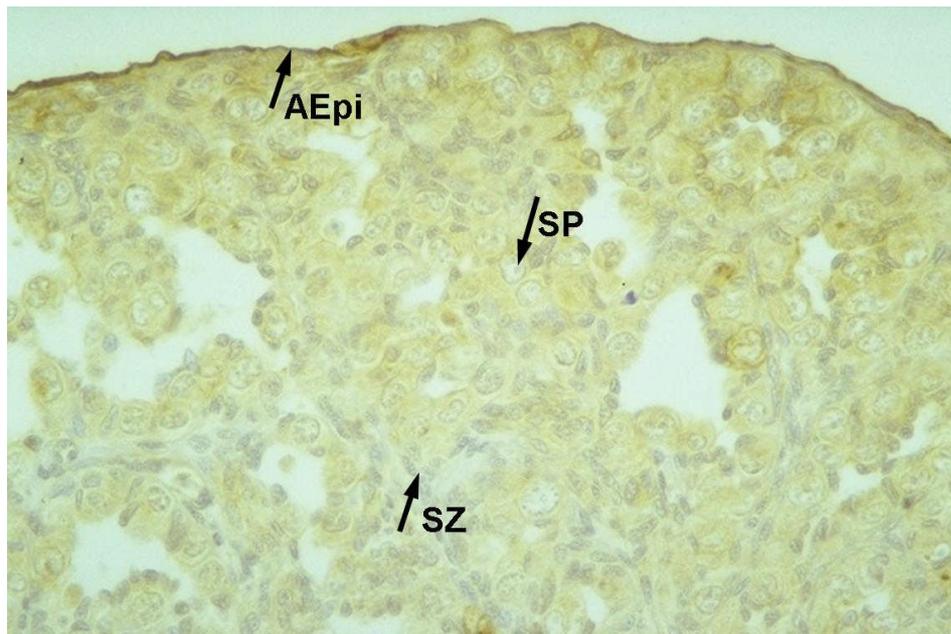
AEpi: Außenepithel, Gef: GefäÙe, OG: Oogonium, Ool: Oolemm,

Zytop: Zytoplasma, OC: Oozyte, FZ: Follikelzellschicht, SZ: somatische Zellen,

Mes: Mesenchym, SP: Spermatogonium, TuEpi: Tubulusepithel

Immunhistochemische Reaktion: -: negativ, +: schwach positiv, ++: deutlich positiv, +++: stark positiv,

/: im Präparat nicht vorhanden

**Abb. 77** *Rana temporaria* (Nr. 1), männlich

Immunhistochemischer Nachweis von ACE im Außenepithel (AEpi)

Primärvergrößerung: 400x

Spermatogonien (SP), somatische Zellen (SZ)

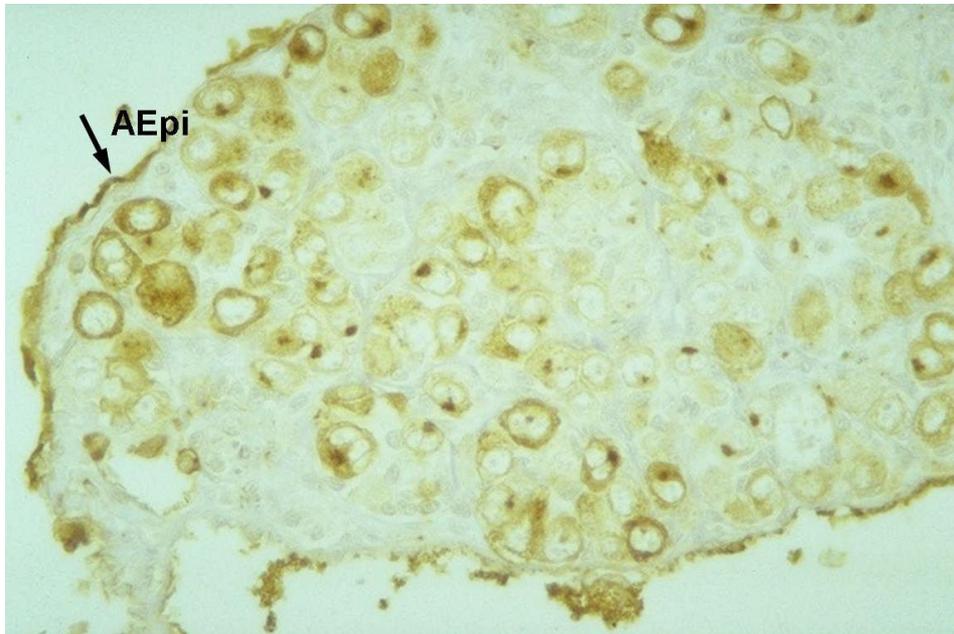


Abb. 78 *Rana temporaria* (Nr. 13), Hermaphrodit II
Immunohistochemischer Nachweis von ACE im Außenepithel (AEpi)
Primärvergrößerung: 400x



Abb. 79 *Rana temporaria* (K_A 29), weiblich
Immunohistochemischer Nachweis von ACE im Außenepithel (AEpi) und
dem Zytoplasma (Zytop) der Oozyten (OC)
Primärvergrößerung: 400x

5. Diskussion

Der seit geraumer Zeit weltweit zu verzeichnende Rückgang von Amphibienpopulationen konnte bisher trotz der bereits bekannten Einflussfaktoren, wie zum Beispiel die Zunahme des Straßenverkehrs und der durch eine Intensivierung der Landwirtschaft bedingte Verlust von Laichgewässern, nicht abschließend geklärt werden. So stellt sich die Frage, ob möglicherweise Störungen des endokrinen Systems als Folge einer Einwirkung von Umweltchemikalien für dieses Phänomen verantwortlich sind. Insbesondere Stoffe mit östrogenen Wirkung, sogenannte Xenoöstrogene sind hierbei von Interesse. Hierzu zählen unter anderem die Alkylphenole (Nonylphenol, Octylphenol), die sich trotz einer freiwilligen Verzichtserklärung der Wirtschaft noch in relevanten Konzentrationen in der Umwelt finden und 2001 in die Liste der prioritären Stoffe der EU-Wasserrahmenrichtlinie aufgenommen wurden. Bisherige Untersuchungen zur Wirkung von Umweltöstrogenen haben sich vor allem auf Fische konzentriert. So ergaben Studien in England ein gehäuftes Auftreten hermaphroditischer Fische in Gewässern unterhalb von Kläranlagen und brachten dies mit der Anwesenheit von Alkylphenolen sowie natürlichen und synthetischen Östrogenen in Verbindung (Purdom et al., 1994, Jobling et al. 1997, Jobling et al. 1998, Tyler und Routledge, 1998). Die Untersuchungsergebnisse bei Fischen werfen die Frage auf, ob Umweltchemikalien auch bei Amphibien eine Störung der Reproduktionsbiologie verursachen können. Ziel vorliegender Dissertationsarbeit ist die Untersuchung und Bewertung der Belastung mit östrogenwirksamen Stoffen in einem süddeutschen Gewässer oberhalb und unterhalb eines Kläranlagenablaufes und deren Auswirkung auf die Gonadenentwicklung von Amphibien (Frösche). In einem Expositionsversuch wurde die Wirkung unterschiedlicher Abwasserverdünnungen auf einheimische Grasfrösche (*Rana temporaria*) mit jener auf den südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) verglichen. Dabei wurden in dieser Untersuchung erstmals histologische Methoden zur Bearbeitung dieser Fragestellung angewendet. In den wenigen Studien, die sich bisher mit der Auswirkung von Umweltchemikalien auf Amphibien befasst haben (Kloas und Lutz, 1997, Lutz und Kloas, 1999, Kloas et al., 1999), erfolgte ausschließlich eine makroskopische Beurteilung der Gonaden. Die hier vorliegende Untersuchung ergab, dass die Befunde der makroskopischen Geschlechtsbestimmung nicht in jedem Fall mit jenen der histologischen Bestimmung übereinstimmen und somit zu falschen Ergebnissen führen können. Weiterhin sind intersexuelle Gonaden, wie sie sowohl bei Grasfröschen als auch bei Krallenfröschen gefunden wurden, ohne eine lichtmikroskopische Untersuchung nicht festzustellen und können somit bei einer ausschließlich makroskopischen Untersuchung im Ergebnis nicht berücksichtigt werden. Da in der aktuellen Literatur die Datenlage bezüglich der Geschlechtsentwicklung und Gonadenmorphologie bei Fröschen sehr dünn ist, wurden

zunächst Basisdaten zur Histologie, Ultrastruktur und Immunhistochemie bei Fröschen erhoben. Bei Grasfröschen erfolgte zudem ein Vergleich der Gonadenentwicklung einer bei uns beheimateten Population mit einer hochalpinen Population.

5.1. Charakterisierung der Gonaden

A Vergleichende Lichtmikroskopie von Gonadengewebe von Rana temporaria und Xenopus laevis

Die Ovarien der Grasfrösche, welche von einem Epithel überzogen wurden, waren fast vollständig von Oozyten und Oogonien ausgefüllt. Das Auftreten von teilungsfähigen Oogonien im Ovar von Amphibien wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Witschi, 1929; Christensen, 1930; Lofts, 1974; Weirich, 1994). Witschi (1929) und Christensen (1930) beschreiben auch bei adulten Tieren noch teilungsfähige Oogonien. Bei vielen Vertebraten hingegen findet die Vermehrung von Oogonien nur während der Embryonalphase statt, so dass postnatal keine Oogonien neu gebildet werden (Franchi et al., 1962). Die in der Literatur (Lofts, 1974, Weirich, 1994) erwähnte Ovarialhöhle konnte nicht immer dargestellt werden. Bindegewebiges Stroma war sowohl bei den Ovarien der juvenilen als auch der subadulten Tiere kaum zu finden, was mit Beobachtungen anderer Untersuchungen (Weirich, 1994) übereinstimmt. Die Oogonien, die sogenannte Keimzellnester bildeten (Lofts, 1974), waren in den Randbereichen lokalisiert. Die im Vergleich zu den Oogonien deutlich größeren Oozyten wurden von einer einschichtigen flachen Follikelzellschicht umgeben. Im Zytoplasma der Oozyten stellte sich bei der lichtmikroskopischen Untersuchung kein Dotterkern dar, so dass die Ovarien aller untersuchten Tiere dem gonadalen Reifegrad I zugeordnet wurden, welcher nach der Stadieneinteilung der Oozytenentwicklung nach Lofts (1974) dem Frühstadium entspricht. Lichtmikroskopisch konnten bei den untersuchten weiblichen Grasfröschen der unterschiedlichen Populationen hinsichtlich der Gonadenmorphologie und der Gonadenreife keine Unterschiede festgestellt werden.

Die Ovarien der juvenilen Krallenfrösche stellten sich weniger kompakt dar als die der Grasfrösche. Das gesamte Organ wies eine girlandenförmige Struktur auf und war ebenfalls von einem Epithel umgeben. Die Oozyten waren zum Teil etwas weniger dicht gepackt als bei *Rana temporaria* und eine Ovarialhöhle war bereits bei einigen der untersuchten Gonaden deutlich zu erkennen. Bindegewebiges Stroma war ebenfalls kaum vorhanden. Wie bei *Rana temporaria* fanden sich auch bei *Xenopus laevis* die Oogonien und kleineren Oozyten peripher im Organ, wohingegen die Oozyten mit dem größten Durchmesser eine zentrale Lage einnahmen. Alle Oozyten waren von einer einschichtigen flachen Follikelzellschicht

umgeben und ließen lichtmikroskopisch keinen Dotterkern erkennen. Somit wiesen auch die Ovarien der Krallenfrösche den gonadalen Reifegrad I auf.

Die untersuchten Hoden der Grasfrösche waren von einem Epithel sowie einer derben Organkapsel überzogen. Eine tubuläre Struktur ließ sich bei den juvenilen Tieren zum Teil angedeutet, bei den subadulten Tieren bereits deutlich erkennen. Die im gesamten Organ verteilten Spermatogonien lagen in Gruppen zusammen. Diese wurden von somatischen Zellen umgeben, welche vermutlich den von Lofts (1968) beschriebenen Follikelzellen entsprechen, welche im Laufe der Gonadenreifung den Sertoli-Zellen der Säuger ähnliche Strukturen entwickeln und kontraktile sowie stützende Eigenschaften besitzen sollen (Lofts, 1974). Anderen Untersuchungen zufolge (Brökelmann, 1964; van Oordt und Brands, 1970) besitzen diese Zellen zu bestimmten Zeitpunkten der Spermatogenese auch die Fähigkeit zur Steroidsynthese. Die von Lofts (1968) beschriebene Membran, welche eine Gruppe von Keimzellen umgibt und mit diesen eine sogenannte Keimzyste bildet, war bei den Hoden der juvenilen und subadulten Grasfrösche vorliegender Studie noch nicht ausgebildet. Das Fehlen der charakteristischen Keimzysten in der Zeit vor der Geschlechtsreife ergaben auch andere Untersuchungen zur Entwicklung des Urogenitalsystems von *Rana temporaria* (Weirich, 1994). Bei den Keimzellen ließen sich zwei verschiedene Typen unterscheiden, wobei es sich vermutlich um primäre und sekundäre Spermatogonien handelte. Eine von Lofts (1974) beschriebene deutliche Eosinophilie der primären bzw. Basophilie der sekundären Spermatogonien konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Hoden sowohl der juvenilen als auch der subadulten Tiere wurden aufgrund der Tatsache, dass neben den Spermatogonien keine weiteren Stadien der Spermatogenese vorhanden waren, dem gonadalen Reifegrad I zugeordnet. Die Hoden der juvenilen Krallenfrösche unterschieden sich von denen der Grasfrösche durch die bei einigen Tieren bereits weiter fortgeschrittene Spermatogenese. Neben Spermatogonien waren bei der Mehrzahl der Tiere Spermatozyten im Gonadengewebe nachweisbar, welches somit den gonadalen Reifegrad II aufwies. Einige Individuen wurden dem Reifegrad III zugeordnet, da sich bei diesen neben Spermatogonien und Spermatozyten sogar bereits Spermatozoen fanden. Somit scheint bei den männlichen Krallenfröschen trotz gleichen Alters, Herkunft und Versuchsbedingungen eine individuelle Variabilität der Gonadenreife zu bestehen.

B Geschlechtsdifferenzierung bei Rana temporaria

Im Hinblick auf die Geschlechtsdifferenzierung bei Grasfröschen erfolgte eine vergleichende histologische Untersuchung der Gonaden von Fröschen einer einheimischen Mittellandpopulation (Wielenbach) (Gruppe Ia, II) und einer hochalpinen Population (Maloja, Schweiz) (Gruppe IIIa, IIIc), wobei jeweils juvenile und subadulte Tiere untersucht wurden. Das bereits früher beschriebene Vorkommen von geschlechtlich differenzierten und geschlechtlich undif-

ferenzierten bzw. semidifferenzierten Rassen bei *Rana temporaria* in Abhängigkeit von der Herkunft der Population (Witschi, 1921, 1930, 1934; Gallien, 1941) konnte in vorliegender Studie bestätigt werden. So erwies sich die Mittellandpopulation als geschlechtlich semidifferenzierte Rasse, die neben eindeutig männlich oder weiblich differenzierten Tieren auch Individuen mit intersexuellen Gonaden erkennen ließ. Bei den juvenilen Tieren (Gruppe Ia) lag der Anteil der weiblichen Tiere je nach Versuchsansatz zwischen 42,6% und 54,6%, die Hermaphroditen machten rund 30% aus, die übrigen Tiere erwiesen sich als phänotypisch männlich. Dies ist damit zu erklären, dass bei Mittellandpopulationen von *Rana temporaria* zunächst auch genotypisch männlich determinierte Individuen Ovarien entwickeln, die sich dann über ein Hermaphroditenstadium in Hoden umwandeln. Die Hermaphroditen ließen dabei unterschiedliche Phasen dieses Transformationsprozesses erkennen. Im Gegensatz zu den geschlechtlich undifferenzierten Rassen, bei welchen der Umwandlungsprozess von Ovarien zu Hoden erst zwischen dem sechsten und neunten Lebensmonat beginnt, weisen die semidifferenzierten Rassen bereits während der Metamorphose hermaphroditische Tiere auf (Gallien, 1974). Ob die Umwandlung von weiblichem in männliches Gonadengewebe bei den untersuchten Tieren bereits während der Metamorphose begonnen hat, wie dies für die semidifferenzierten Rassen beschrieben ist, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Das Auftreten von ausdifferenziertem Hodengewebe bei einigen Tieren, sowie ein zum Teil schon sehr weit fortgeschrittener Umwandlungsprozess weisen jedoch darauf hin. Bei der Untersuchung von ca. 1,5 Jahre alten Tieren derselben Population fanden sich neben weiblichen und männlichen Tieren ebenfalls noch Hermaphroditen in unterschiedlichen Stadien der Transformation. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, wann der Transformationsprozess bei diesen Tieren komplett abgeschlossen ist oder ob eventuell bei einigen Tieren degenerierte Oozyten im Hodengewebe verbleiben. Witschi (1921) geht davon aus, dass der Transformationsprozess bei geschlechtlich undifferenzierten Tieren oft bis in das zweite Lebensjahr andauert und sich manchmal auch noch bei adulten Tieren im Hodengewebe einzelne Oozyten finden. Die Frage, ob bei diesen Tieren die Oozyten noch vollständig degenerieren, oder ob sie funktionslos im Gewebe verbleiben, bleibt unbeantwortet. Die semidifferenzierten Rassen repräsentieren einen intermediären Typ und sind nicht an bestimmte Regionen gebunden (Gallien, 1974), wohingegen die geschlechtlich undifferenzierten Rassen meist aus flacher gelegenen Regionen stammen. Bei der hochalpinen Population wiesen hingegen weder die juvenilen noch die subadulten Frösche intersexuelle Gonaden auf, so dass es sich bei diesen Tieren um eine geschlechtlich differenzierte Rasse handelt. Rassen mit einer derartigen Geschlechtsentwicklung wurden von Witschi (1930) in den Alpen bei Davos und von Gallien (1941) in den Pyrenäen bei Pratlong beobachtet.

Zur Bestimmung des Transformationsstadiums wurden morphologische Kriterien erarbeitet, welche eine Einteilung ermöglichten.

Stadium I: Dieses Stadium war gekennzeichnet durch eine beginnende Einwanderung von Medullargewebe in das ansonsten unveränderte Ovar. Dieser Prozess begann am Hilus, da sich dort der rudimentäre Rest des Markgewebes befindet, welcher bei der Entwicklung des Ovars von der auswachsenden Rinde verdrängt wurde und breitete sich dann entlang der Achse im gesamten Organ aus. Entgegen den Beschreibungen von Witschi (1921), der gleich zu Anfang des Prozesses einwandernde Spermatogonien beobachtete, dominierte eine homogene Grundsubstanz mit wenigen zellulären Bestandteilen. Spermatogonien traten in dieser Phase nicht auf. In einigen Fällen konnte in einer sehr frühen Phase bereits eine Oozytendegeneration in direkter Nachbarschaft zum eingewanderten Gewebe beobachtet werden, teilweise auch in Ovarregionen, die vom Umwandlungsprozess noch nicht „betroffen“ waren. Da sich jedoch nicht bei allen Ovarien in Stadium I eine Oozytendegeneration erkennen ließ, wurden Degenerationserscheinungen nicht als obligatorisches morphologisches Merkmal für das Stadium I gewertet.

Stadium II: Das Medullargewebe breitete sich weiter aus und infiltrierte nach und nach das gesamte Organ. Dieses Stadium ging immer mit einer Oozytendegeneration einher, primär in Ovarregionen die vom einwandernden Medullargewebe bereits infiltriert worden waren oder an das eingewanderte Medullargewebe angrenzten, aber auch in bis dahin unverändertem Ovarialgewebe. Nach den Beschreibungen von Witschi (1921) ist mit der Einwanderung des Medullargewebes ein Kompakterwerden des Keimepithels verbunden. Dies konnte bei den hier untersuchten Gonaden nicht eindeutig festgestellt werden. Der Infiltration und Oozytendegeneration folgte das erste Auftreten von Spermatogonien. Die Anzahl der zu beobachtenden Spermatogonien in diesem Stadium war sehr unterschiedlich, aber allen untersuchten Gonaden in diesem Stadium war gemeinsam, dass das Ovarialgewebe noch deutlich vorherrschend war. Ob es zu einer Einwanderung von Spermatogonien kommt oder ob die Oogonien die Fähigkeit besitzen, sich in Spermatogonien umzuwandeln, ist nicht geklärt. Foote und Witschi (1939) konnten bei Versuchen mit *Rana clamitans* zeigen, dass bei einer phänotypischen Umwandlung des Geschlechts, Oogonien zu Spermatogonien transformiert werden können.

Stadium III: Im Stadium III des Transformationsprozesses war Hodengewebe vorherrschend. Im gesamten Gonadengewebe fanden sich Spermatogonien und somatische Zellen. Die noch vorhandenen Oozyten lagen vereinzelt im Hodengewebe und befanden sich zum größten Teil in Degeneration. Oogonien waren nicht mehr zu finden. Bei einigen Gonaden in diesem Transformationsstadium war schon eine deutliche tubuläre Struktur zu erkennen, andere wiesen noch eine ungeordnete Struktur von somatischen Zellen und Keimzellen auf.

Die bereits von Witschi (1921) beschriebenen Sonderformen wie lateraler Hermaphroditismus und deutliche Unterschiede im Transformationsprozess innerhalb einer Gonade, konnten auch bei einigen der hier untersuchten Grasfrösche gefunden werden. Bei einem lateralen Hermaphroditismus unterliegt eine Gonadenseite bereits dem Transformationsprozess und weist somit einen intersexuellen Charakter auf, während die andere Seite noch keine Anzeichen eines Umwandlungsprozesses erkennen lässt. Mehrere Transformationsstadien in einem Organ können vorkommen, wenn das einwandernde Medullargewebe nicht entlang der Achse wandert und „gleichmäßig“ die ganze Gonade infiltriert, sondern sich zunächst nur in einem Pol ausbreitet. Bei einigen Gonaden konnten alle drei Transformationsstadien in einem Organ beobachtet werden.

Elektronenmikroskopie von Gonadengewebe von Rana temporaria

Neben der lichtmikroskopischen Untersuchung der Gonaden aller Grasfrösche wurden die Gonaden von jeweils sechs Tieren der Gruppen II, IIIa, und IIIb und von neun Tieren der Gruppe Ia elektronenmikroskopisch untersucht. Die Tiere erwiesen sich alle als eindeutig geschlechtlich differenziert; Hermaphroditen fanden sich nicht.

Die Ovarien der Grasfrösche waren von einem einschichtigen Epithel umgeben, welches durch eine Basallamina von dem darunter liegenden Stroma abgegrenzt war. Die Oozyten der subadulten (Gruppe III, IIIb) und der juvenilen Tiere (Gruppe Ia, IIIa) befanden sich im Frühstadium der Entwicklung. Die Oozyten wiesen einen im Vergleich zum Zelldurchmesser relativ großen Kern mit mehreren peripher liegenden Nukleoli auf. Dies entspricht den Beschreibungen von Lofts (1974). Die relativ geringe Elektronendichte der Zellkerne ist ein Hinweis auf einen hohen Anteil an Euchromatin und somit auf eine hohe genetische Aktivität. Jede einzelne Oozyte wurde von einer einschichtigen Follikelzellschicht umgeben. Die Follikelzellen stellten sich sowohl bei den juvenilen als auch bei den subadulten Grasfröschen im Vergleich zu den Oozyten als kleine flache Zellen dar, die keine interzellulären Zwischenräume erkennen ließen. Weirich (1994) konnte auf elektronenmikroskopischer Ebene (212000x) bereits bei juvenilen Tieren Mikrovilli an der Oberfläche von Oozyten darstellen. Diese konnten in der vorliegenden Untersuchung erst bei subadulten Tieren nachgewiesen werden. Im Zytoplasma der Oozyte waren bei den subadulten Tieren zahlreiche Organellen, vor allem Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum darstellbar was für eine hohe Stoffwechselaktivität spricht. In geringerer Anzahl fanden sich diese Strukturen auch bei den juvenilen Tieren. Dotterkerne sowie Ansammlungen von Mitochondrien und anderen Organellen in unmittelbarer Nähe des Kerns wurden nicht gefunden. Nach Lofts (1974) finden sich Dotterkerne erst in der previtellogenen Phase der Oozytenentwicklung. Weirich (1994) hingegen wies den Dotterkern während der gesamten Ontogenese nach.

Lang-gestreckte Mitochondrien vom Tubulus-Typ waren nur bei weiblichen Keimzellen zu beobachten. Auch Weirich (1994) wies diesen Mitochondrientyp nur im Zytoplasma weiblicher Keimzellen nach. Bei den subadulten Tieren stellten sich in einigen der lang-gestreckten Mitochondrien elektronendichte runde Strukturen dar. Dabei handelt es sich vermutlich um Dotterkristalle, d. h. eine Ansammlung von Dotter innerhalb von Mitochondrien. Weirich (1994) konnte diese Dotterkristalle innerhalb von Mitochondrien mit abnehmender Häufigkeit kontinuierlich während der gesamten Entwicklung der Ovarien nachweisen. Diese Strukturen finden sich Angaben von Follett und Redshaw (1974) zufolge ausschließlich bei Raniden. Die Entstehungsweise und genaue Funktion der Dotterkristalle sind bislang unbekannt. Wartenberg (1962) geht davon aus, dass diese von den Mitochondrien abgeschnürt werden und an der Bildung der Dotterpartikel beteiligt sind.

Direkt unterhalb der Plasmamembran waren im Zytoplasma der subadulten Tiere Ansammlungen elektronendichter Granula zu beobachten. Auch Weirich (1994) beschrieb derartige Strukturen bei Grasfröschen und vermutete, dass es sich dabei um Vorstufen der Kortikalgranula handelte, kleine sphärische, membranumschlossene Strukturen, die unterhalb der Plasmamembran noch nicht reifer Oozyten liegen und später eine Rolle bei der Ausbildung der Befruchtungsmembran spielen.

Der Hoden wird von einer zweischichtigen Hülle, bestehend aus Peritonealepithel und Tunica albuginea begrenzt. Die Basalmembranen beider Schichten ließen sich gut darstellen. Zwischen den beiden Schichten zeigten sich kollagene Fasern. Pigmenteinlagerungen, die von Weirich (1994) unterhalb der Tunica albuginea beschrieben wurden, fanden sich auch hier in größeren Mengen zwischen den beiden Hüllschichten. Kapillaren, die sich unter anderem ebenfalls direkt unter der Tunica albuginea befanden, waren gefüllt mit kernhaltigen Erythrozyten. Die fehlende Fenestrierung der Kapillarendothelien bei *Rana temporaria* (Weirich, 1994) und anderen Anura (Unsicker, 1975) zeigte sich auch in vorliegender Untersuchung. Weirich (1994) schließt daraus auf einen im Gegensatz zu höheren Vertebraten verlangsamten Stoffaustausch. Die Tubuli seminiferi stellten sich in lockeres Bindegewebe eingebettet und von einer Lamina propria umhüllt dar. Die Lamina propria besteht aus einer Basallamina, der das Keimepithel aufsitzt, sowie aus lockerem Bindegewebe mit Fibrozyten und kollagenen Fasern. Kontraktile Elemente, wie glatte Muskelzellen oder Myofibroblasten fanden sich nicht. Auch Weirich (1993) konnte in der Lamina propria der Tubuli seminiferi von Hoden juveniler Grasfrösche keine kontraktile Elemente nachweisen und auch bei adulten Tieren fehlten solche Strukturen (Unsicker, 1975). Die Tubuli seminiferi der Reptilien und Säugetiere besitzen Myofibroblasten (Unsicker und Burnstock, 1975). Die Frage des Spermientransports bei Amphibien ist noch weitgehend ungeklärt. Vermutlich ermöglicht ein

Anstieg des Flüssigkeitsgehalts im Tubulus mit einem abschließenden Abfluss in Richtung Ductuli efferentes den Spermientransport (van Oordt et al., 1954).

Neben somatischen Zellen fanden sich in den Hoden der juvenilen (Ia, IIIa) und der subadulten Tiere (Gruppe II, IIIb) ausschließlich Spermatogonien. Daraus lässt sich schließen, dass die Spermiogenese der Grasfrösche zu einem späteren Zeitpunkt als die Oogenese beginnt. Dass die Spermatogonien bei *Rana temporaria* wesentlich später in die Phase der mitotischen Vermehrung eintreten als die Oogonien beobachtete auch Weirich (1994). Die Keimzellen unterschieden sich durch ihren charakteristischen Kern deutlich von den somatischen Zellen. Der große, unregelmäßig geformte Kern wies im Elektronenmikroskop eine geringe Dichte und somit einen prozentual hohen Anteil an Euchromatin auf, was auf eine hohe genetische Aktivität schließen lässt. Im Zytoplasma fanden sich große Mengen an rauhem endoplasmatischem Retikulum sowie Mitochondrien. Die von Weirich (1994) beschriebenen, um eine zentrale elektronendichte Substanz angeordneten Aggregate von 5-6 Mitochondrien wurden nicht beobachtet. Neben den länglichen tubulären Mitochondrien fanden sich in den männlichen Keimzellen hauptsächlich ovale Mitochondrien vom Cristae-Typ. Auch in anderen Arbeiten werden kurze Mitochondrien mit dichten Tubuli beschrieben (Weirich, 1994). Eine Differenzierung zwischen helleren Spermatogonien mit vielen Vesikeln und Dictyosomen und dunkleren Spermatogonien mit reichlich rauhem endoplasmatischem Retikulum (Weirich, 1994) konnte bei den hier untersuchten Hoden nicht gemacht werden. Weirich (1994) zufolge bilden Spermatogonien Mikrovilli zu ihren Nachbarzellen aus, welche jedoch in vorliegender Arbeit nicht nachzuweisen waren. Innerhalb der Tubuli konnten Desmosomen dargestellt werden, welche jedoch nicht einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen waren. Leydig'sche Zwischenzellen wurden vereinzelt in kleinen Ansammlungen im Interstitium gefunden. Der im Vergleich zu den Sertoli-Zellen breite Plasmasaum enthielt neben Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat zahlreiche Granula. Die Granularvesikel hatten keine einheitliche Elektronendichte und Struktur. Während einige eine hohe Dichte zeigten, wiesen Vesikel mit einer schwächeren Elektronendichte eine gekörnte Struktur und zum Teil einen lamellären Aufbau auf. Auch Weirich (1994) beschrieb im Zusammenhang mit den Leydig'schen Zwischenzellen juveniler Grasfrösche auffallend dunkle Vesikel. Unsicker (1975) ordnet diese Strukturen auf Grund ihrer Membranbegrenzung in die Gruppe der Lysosomen. Diese Zellorganellen, deren Größe meist zwischen 0,2 und 0,5 µm liegt und eine variable meist rundliche Struktur haben, enthalten zahlreiche hydrolytische Enzyme (Sinowatz, 1992). Bei adulten Fröschen ist das Auftreten der Granularvesikel in den Leydig'schen Zwischenzellen, ebenso wie das einiger anderer Organellen, jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen. Von Dezember bis Ende April, einer Zeit verstärkter Androgenproduktion, ist das endoplasmatische Retikulum der Leydig'schen Zwischenzellen gut entwickelt und es finden sich zahlreiche Granularvesikel und tubuläre Mitochondrien. Die Zahl

an Lipideinschlüssen ist zu dieser Zeit gering. Hingegen ab Ende April, nach Abschluss der Spermiation, finden sich vermehrt Lipideinschlüsse. Das endoplasmatische Retikulum ist dann nur schwach entwickelt und die Anzahl der Granularvesikel ist gering. Körperchen mit hoher Elektronendichte scheinen vermehrt zu sein (Unsicker, 1975).

Immunhistochemie

Um weitere Erkenntnisse über die funktionelle Morphologie der Gonaden von Fröschen zu gewinnen, wurden verschiedene Antikörper zur spezifischen Darstellung einzelner Strukturen ausgetestet. Für die Darstellung wurde die Avidin-Biotin-Komplextchnik nach Hsu et al. (1981) angewandt.

Laminin, ein nicht-kollagenes Glykoprotein, das sowohl funktionelle als auch strukturelle Aufgaben übernimmt, ist bei Säugetieren ein Bestandteil der Basalmembran. Von Laminin existieren verschiedene Isoformen (Martin und Timpl, 1987). Laminin hat die Eigenschaft, sowohl mit sich selbst als auch mit anderen Membranbestandteilen (Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykane usw.) zu polymerisieren. Mit seinen vielen Domänen ist Laminin der ideale Vermittler zwischen den zahlreichen Komponenten der Basalmembran und spielt eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der komplexen dreidimensionalen Matrix der Basalmembran (Beck et al., 1990; Martin und Timpl, 1987). Zur Zusammensetzung der Basalmembran von Fröschen oder allgemein von Amphibien liegen keine Daten vor. Alle Strukturen die mit dem aviären anti-Laminin-Antikörper reagierten, wiesen bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung eine Basalmembran auf. Somit scheint auch in der Basallamina von Fröschen ein, dem Laminin der Säugetiere strukturell ähnliches Glykoprotein, vorhanden zu sein. Die Basallamina des Serosaepithels der Gonaden, welche sich elektronenmikroskopisch gut darstellen ließ, reagierte bei weiblichen Tieren und Hermaphroditen im Transformationsstadium I schwach positiv, bei männlichen Individuen und Hermaphroditen im Transformationsstadium II hingegen deutlich positiv. Das Außenepithel der Gonaden liegt einer Basalmembran auf, die elektronenmikroskopisch dargestellt werden konnte. Die männlichen Gonaden sind neben dem Peritonealepithel von der Tunica albuginea umgeben, welche ebenfalls einer Basalmembran aufliegt. Die immunhistochemische Reaktion dieser beiden, lichtmikroskopisch nicht von einander zu differenzierenden Schichten, könnte die deutlich positive Markierung des Hodens erklären. Auch die Basallamina der Follikel-epithelschicht der Ovarien, die Basalmembran des Tubulusepithels der Hoden und die Basalmembran der Gefäße reagierten schwach positiv.

Aktin ist ein Faserprotein, das an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt ist, wie etwa der Zellbewegung, der Zellteilung und der Muskelkontraktion. Aufgrund dessen ist Aktin in fast allen eukaryotischen Zellen zu finden. Es gibt drei verschiedene Formen von Aktin. •- und •-Aktin finden sich im Zytoskelett jeder Zelle. Das •-Aktin, auf welches in

dieser Untersuchung Bezug genommen wird, findet sich in der glatten Muskulatur (Wassarmann, 1983). Aktinfilamente von 1µm Länge bilden dort ein Raumnetz, welches die Myosinfilamente mantelartig umgibt (Liebich, 1993). Ein Aktinfilament besteht dabei aus ca. 200 kettenförmig zusammengesetzten, kugelförmigen Aktinmolekülen (Kreutzig, 1990). Die für die glatte Muskulatur typischen Isoformen von Aktin und Myosin konnten in der Theka externa verschiedener Spezies, wie z. B. Ratten (Amsterdam et al., 1977), Hamster (Self et al., 1988) und beim Menschen (Wallis et al., 1990) nachgewiesen werden. Über die Funktion der kontraktilen Theka externa-Zellen herrscht noch weitgehend Unklarheit. Am Ovar von Amphibien wurde die Anwesenheit von Aktin bisher nicht untersucht. Ein immunhistochemischer Nachweis von Aktin verlief im Bereich der Oozyten, einschließlich umgebender Follikelzellen, negativ. Die im Zytoplasma beobachtete schwach positive Reaktion wird als unspezifisch angesehen. Somit konnten in der die Oozyten im Frühstadium umgebenden Schicht keine Aktinfilamente nachgewiesen werden. Eine deutlich positive Reaktion ließ sich jedoch an den Gefäßwänden von Arterien erkennen. Arterien haben immer einen dreischichtigen Aufbau, bestehend aus Tunica intima, Tunica media und Tunica externa. Die Tunica media ist eine Muskelschicht, bestehend aus glatten Muskelzellen in vorwiegend ringförmiger Anordnung (Hees, 1992).

Die Zona pellucida (ZP) befindet sich bei Säugetieren zwischen Oolemma und den umgebenden Follikelzellen. Die Glykoproteinschicht nimmt wichtige Aufgaben im Rahmen des Reproduktionsvorgangs wahr. An diese Schicht binden die Spermien und penetrieren diese, um die Eizelle zu befruchten. Nach erfolgter Fertilisation beteiligt sich die ZP daran, eine Polyspermie zu verhindern. Darüber hinaus schützt die ZP den jungen Embryo bis zum Zeitpunkt der Implantation. Sie besteht je nach Spezies aus drei bis fünf Arten von Glykoproteinen (Dunbar et al., 1985; Sacco et al., 1981). Die in dieser Untersuchung verwendeten Antikörper richten sich gegen das porcine Glykoprotein ZP3. Dieses stellt mit 70-80% die Hauptkomponente der ZP des Schweines dar. ZP3 besteht aus zwei chemisch und antigenetisch verschiedenen Komponenten, dem ZP3⁺ mit saurem Charakter und dem ZP3⁻ mit basischem Charakter. Diese beiden Komponenten besitzen jeweils unterschiedliche Polypeptidketten und können immunologisch voneinander unterschieden werden (Yurewicz, 1987; Wassarmann, 1988). Die untersuchten Gonaden zeigten mit keinem der beiden Antikörper (ZP3⁺, ZP3⁻) eine spezifische Reaktion. Lediglich schwache unspezifische Reaktionen mit dem Außenepithel der Gonaden konnten bei einigen Tieren beobachtet werden. Die Möglichkeit, dass eine Zona pellucida vorhanden ist, die Glykoproteine jedoch in ihrer Antigenität keine Ähnlichkeit mit den ZP3⁺ und ZP3⁻ des Schweines besitzen, ist zwar gegeben, eine Glykoproteinschicht bei Anuren wird jedoch von keinem Autor im Zusammenhang mit der mikroskopischen Anatomie der Ovarien von *Rana temporaria* oder anderen Froscharten erwähnt. Raven (1961) beschreibt bei Grasfröschen das Auftreten einer Mukopolysaccharidschicht ab

der vitellogenen Phase zwischen der Eizelle und Follikelzellschicht. Diese wird von Raven (1961) und Lofts (1974) als Vitellinmembran bezeichnet. Während der Ovulation löst sich die Oozyte aus der Follikelzellschicht und ist weiterhin von der Vitellinmembran umgeben, welche anschließend die „Fertilisationsmembran“ bildet (Lofts, 1974). Da es sich bei den untersuchten Grasfröschen um juvenile bzw. subadulte Tiere handelte und die Oozyten sich alle in der Frühphase der Entwicklung befanden, war diese Mukopolysacharidschicht noch nicht ausgebildet.

Das Angiotensin Converting Enzym (ACE) lässt sich in zwei Isoenzyme unterteilen. Das somatische Isoenzym (ACEs) kommt im Blut und in verschiedenen Geweben vor und katalysiert die Abspaltung von C-terminalen Peptiden. Im Renin-Angiotensin-System katalysiert ACEs die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II und hat somit einen Einfluss auf die Blutdruckregulation. Angiotensin II bewirkt über eine vermehrte Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde eine erhöhte Na^+ - und Wasser-Retention in der Niere und wirkt außerdem gefäßverengend (Karlson et al., 1994). Speth et al. (1999) vermutet eine mögliche Funktion dieses Proteins bei der Fortpflanzung. Eine ausschließlich lokale Wirkung hat das testikuläre Isoenzym (ACEt), welches in Spermatozoen und reifen Spermien zu finden ist. Versuche, bei denen mit Hilfe von „gen-targeting“ die Expression des ACE-Gens bei Mäusen gehemmt wurde, ergaben, dass das testikuläre ACE einen Einfluss auf die in-vivo-Befruchtung hat (Hagaman et al., 1998). Bei den Männchen des ACEt-insuffizienten Mäusestamm zeigte sich gegenüber des Wildtyps eine deutlich herabgesetzte Fruchtbarkeit. Obwohl die Morphologie, Anzahl und Vitalität der gebildeten Spermien unverändert war, konnten Störungen beim Transport der Samenzellen im Ovidukt und bei der Bindung an die Zona pellucida beobachtet werden. Der immunhistochemische Nachweis von ACE ergab bei den weiblichen Gonaden ausschließlich unspezifische, schwach positive Reaktionen mit dem umgebenden Epithelüberzug und dem Zytoplasma der Oozyten. Das untersuchte männliche Tier zeigte eine deutlich positive Reaktion des Außenepithels, alle anderen untersuchten Strukturen zeigten keine Reaktion. Die Spermatozoen eines Hermaphroditen im Transformationsstadium II wiesen ebenfalls eine schwach positive Reaktion auf. In allen Fällen scheint eine unspezifische Reaktion bzw. Kreuzreaktion mit einem anderen Antigen wahrscheinlich. So wurde ACEt auch bei Säugetieren ausschließlich in Spermatozoen und Spermien nachgewiesen.

5.2. „Anwendungsbeispiel“ – Expositionsversuch

A. Charakterisierung der Gewässerbelastung

Zur Charakterisierung der Belastung eines Gewässers mit östrogenen Stoffen erfolgten Untersuchungen an der Würm sowie des Auslaufs der Kläranlage Starnberg. In den Wasserproben wurden die Konzentrationen der Hormone 17 β -Estradiol, Estron und Ethinylestradiol sowie der Alkylphenole Nonylphenol und Octylphenol bestimmt. Die Belastung sowohl des Würmwassers als auch des Abwassers war in der Regel als gering anzusehen. Eine Ausnahme bildete eine relativ hohe Alkylphenolbelastung des Würmwassers während der ersten Hälfte des Expositionsversuchs. Die infolge einer Hochwassersituation in einem mit Industrieabwässern belasteten Seitengewässer in der Würm auftretenden Konzentrationen von bis zu 1000 ng NP/l und 200 ng OP/l entsprachen in etwa einer 4-fachen Überschreitung der Zielvorgabe für aquatische Lebensgemeinschaften von 0,3 μ g/l für die Summe aller Alkylphenoethoxylate (Stoffdatenblatt Alkylphenoethoxylate, Arbeitsliste UBA, 1998). Diese außergewöhnliche Belastung der Würm führte dazu, dass Würmwasser-exponierte Frösche über einen begrenzten Zeitraum (20.04.-27.06.00) einer höheren Alkylphenolbelastung ausgesetzt waren als die den Abwasserverdünnungen ausgesetzten Tiere. Anschließend lagen die Konzentrationen wieder in dem für die Würm 1999 gemessenen, niedrigen „Normalbereich“ (13-21 ng/l Nonylphenol, 1,3-2,6 ng/l Octylphenol) (Negele, 1999) und sogar unter dem Durchschnittswert von 34 ng/l Nonylphenol für bayerische Oberflächengewässer (LfW, 1998). Insgesamt ist die Belastungssituation in Deutschland als deutlich geringer einzustufen als im europäischen Ausland. So lag zum Beispiel die maximale NP-Konzentration bei 1994 in England durchgeführten Messungen von Flusswasser bei 180 μ g/l und die minimale Konzentration bei 0,2 μ g/l (Blackburn und Waldock, 1995). Die Belastung des Würmwassers oberhalb der Kläranlage Starnberg mit östrogenen Hormonen war während des gesamten Messzeitraums relativ gering. So wurden Maximalwerte von 1 ng β -Estradiol/l, 2 ng Estron/l und 1,1 ng Ethinylestradiol/l gemessen, wobei β -Estradiol und Ethinylestradiol in der Mehrzahl der Proben unterhalb der Nachweisgrenze (0,3 ng/l) lagen. Während Kalbfus (1997) kein Ethinylestradiol in bayerischen Fließgewässern nachweisen konnte, ergaben Messungen in Schweizer Fließgewässern vereinzelt Ethinylestradiolkonzentrationen bis zu 5 ng/l (Stumpf et al., 1996).

Die Alkylphenolbelastung des Kläranlagenabwassers lag zwischen 23 und 290 ng/l und somit deutlich unterhalb veröffentlichter Vergleichswerte. Nach Angaben von Zellner und Kalbfus (1997) sowie Ell (1998) wurden in bayerischen Flüssen unterhalb von Kläranlagenabläufen Nonylphenol-Konzentrationen zwischen 100 und 400 ng/l gemessen. In verschiedenen Kläranlagenabläufen Baden Württembergs wurden NP-Konzentrationen bis zu 1 μ g/l

nachgewiesen (Körner et al., 1998). Messungen von Kläranlagenausläufen in England ergaben Maximalwerte von 330 µg NP/l (Blackburn und Waldock, 1995). Die Octylphenolkonzentrationen lagen zwischen 2 und 16 ng/l (Körner et al., 1998). Während des Expositionsversuchs war die Belastung des Kläranlagenabwassers mit östrogenen Hormonen geringfügig höher als die des Würmwassers. Die \bullet -Estradiol-Konzentrationen lagen zum Teil unterhalb der Nachweisgrenze, erreichten aber auch Werte bis zu 2 ng/l. Estron wurde in Konzentrationen zwischen 1 und 1,2 ng/l nachgewiesen. Ethinylestradiol war zum Teil in niedrigen Konzentrationen zwischen 0,3 und 0,5 ng/l messbar. Die Ethinylestradiol-Belastungen decken sich mit im Rahmen anderer Untersuchungen an bayerischen Kläranlagenabläufen ermittelten Werten (Kalbfus, 1997), welche ebenfalls knapp oberhalb der Nachweisgrenze von 0,3-0,5 ng/l lagen. Stumpf et al. (1996) wiesen bei ihren Untersuchungen von Schweizer Kläranlagenabläufen deutlich höhere Hormonbelastungen nach (Maximalwerte: 62 ng/l Ethinylestradiol; 21 ng/l \bullet -Estradiol).

B. Auswirkung auf die Larvalentwicklung

Während der Exposition wurden bei Grasfröschen Untersuchungen zur Larvalentwicklung durchgeführt. Die Bestimmung der vorliegenden Entwicklungsstadien erfolgte an Tag 22 (26.04.00) und 37 (11.05.00) der Exposition. Kontrollen und Abwasser-exponierte Tiere wiesen zu beiden Zeitpunkten ein vergleichbares Entwicklungsstadium auf.

Die bei *Rana temporaria* parallel zu den Entwicklungsstadien durchgeführte Bestimmung des Körpergewichts ergab am 26.04.00 ein leicht erhöhtes, am 11.05.00 ein signifikant höheres Durchschnittsgewicht bei den Tieren, die dem Abwasser in einer Verdünnung von 2:1 ausgesetzt waren. Dieses im Durchschnitt höhere Körpergewicht ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf das höhere Nährstoffangebot im Abwasser im Vergleich zum Würmwasser zurückzuführen. Weiterhin war zu beiden Zeitpunkten eine große Streuung der gemessenen Körpergewichte zu beobachten. Als mögliche Erklärung kann die sich durch die experimentellen Haltungsbedingungen ergebende, im Vergleich zu natürlichen Lebensbedingungen hohe Besatzdichte herangezogen werden. Eine dadurch entstehende höhere Nahrungskonkurrenz kann dann trotz ausreichendem Futterangebot zu einem deutlichen „Auseinanderwachsen“ der Kaulquappen führen.

Die an Tag 7 (11.04.00) und Tag 41 (15.05.00) der Exposition durchgeführte Bestimmung der Entwicklungsstadien bei *Xenopus laevis* ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Abwasser-exponierten Tieren. Dies bestätigt die bereits für die Larvalentwicklung von *Rana temporaria* getroffene Annahme, dass das Abwasser keinen direkten Einfluss auf die Entwicklung der Frösche ausübte.

C. *Histopathologische Gonadenbefunde: Gonadenreifung, Geschlechterverhältnis, Intersexualität*

Im Rahmen der histologischen Untersuchung erfolgte anhand morphologischer Kriterien eine Bestimmung des gonadalen Reifegrades. Weder bei den Krallenfröschen noch bei den eindeutig männlich oder weiblich differenzierten Grasfröschen waren diesbezüglich signifikante Unterschiede zwischen den Würmwasser- und den Abwasser-exponierten Gruppen zu beobachten. Bei Grasfröschen und Krallenfröschen wies weibliches Gonadengewebe durchgehend den Reifegrad I auf, also ein sehr frühes Entwicklungsstadium. Das Hodengewebe der männlichen Grasfrösche aller Gruppen ließ generell nur Spermatogonien erkennen und wies somit ebenfalls Reifegrad I auf. Im Gegensatz dazu war bei männlichen Krallenfröschen aller Gruppen ein variierender Reifegrad I-III des Hodengewebes nachweisbar. Untersuchungen zur Gonadenreifung bei Fröschen im Zusammenhang mit einer östrogenen Belastung von Gewässern wurden bisher nicht durchgeführt. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen jedoch mit Befunden an Regenbogenforellen überein, bei denen nach Einwirkung von Nonylphenol (1 µg/l, 10 µg/l) ebenfalls keine Effekte auf die Gonadenreifung und Geschlechtsentwicklung beobachtet wurden (Ackermann et al., 2002).

Anhand des histologisch bestimmten Geschlechts erfolgte eine statistische Auswertung der Geschlechterverhältnisse von *Rana temporaria* und *Xenopus laevis*. Bei den Grasfröschen ergab sich zwischen der Kontrollgruppe und den Abwasser-exponierten Tieren kein signifikanter Unterschied. Die Versuchsgruppen ließen mit 52,8% (12:1-Abwasserverdünnung) und 42,6% (2:1-Abwasserverdünnung) weiblichen Tieren im Vergleich zur Kontrolle mit 54,4% lediglich eine tendenzielle Abnahme des Weibchenanteils erkennen. Angaben zum Geschlechterverhältnis von *Rana temporaria* sind in Veröffentlichungen fast ausschließlich anhand populationsdynamischer Untersuchungen gemacht worden (Oldham, 1963; Geisselmann et al, 1971; Obert, 1977; Grossenbacher, 1980; Blab, 1982; Gibbons und Mc Carthy, 1984; Hintermann, 1984; Ryser, 1986). Der Anteil der weiblichen Tiere lag bei diesen Untersuchungen zwischen 30-58%. Anhand von Rückkreuzungsversuchen konnte gezeigt werden, dass das Geschlecht bei *Rana temporaria* genetisch determiniert ist (Kawamura und Yokota, 1958; Richards und Nace, 1978). Zahlreiche Untersuchungen zeigten jedoch, dass bei *Rana* spp. die Gonadenbildung und damit das gonadale Geschlecht während der Larvalentwicklung hormonabhängig ist, so dass trotz genetisch determiniertem Geschlechts durch künstliche Zugabe von Androgenen oder Östrogenen eine Vermännlichung bzw. Verweiblichung herbeigeführt werden konnte (Witschi, 1948; Witschi und Allison, 1950; Chang und Witschi, 1955c; Gallien, 1937, 1940, 1941, 1943). Die in den Versuchen angewandten Konzentrationen lagen jedoch um ein vielfaches höher als die in vorliegender Studie im Würmwasser und Abwasser gemessenen Hormonkonzentrationen (0,3-2 ng/l). So entwickelten sich bei einer Konzentration von 19 µg • -Estradiol/l ausschließlich Frösche mit

weiblichen Gonaden (Chang und Witschi, 1955c). Untersuchungsergebnisse zum Einfluss von Alkylphenolen auf das Geschlechterverhältnis von Amphibien liegen nur für Krallenfrösche vor (Kloas et al., 1999) und ergaben erst ab einer Konzentration von 10^{-7} Mol (\bullet 22 μ g/l) Nonylphenol und 10^{-8} Mol (\bullet 2 μ g/l) Octylphenol einen signifikanten Anstieg des Weibchenanteils. Bei Untersuchungen an Regenbogenforellen konnte nach Einwirkung von Nonylphenol (1 μ g/l, 10 μ g/l) keine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden (van der Heyde, 2000). Unter Berücksichtigung dieser Untersuchungsergebnisse erscheint ein ursächlicher Zusammenhang zwischen einem tendenziell etwas höheren Weibchenanteil in der Kontrollgruppe und der 12:1-Versuchsgruppe und einer zu Beginn des Versuchs kurzzeitig hohen Alkylphenolbelastung (1 μ g NP/l und 0,2 μ g OP/l) des Würmwassers unwahrscheinlich.

Auch bei *Xenopus laevis* wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Würmwasser-Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen hinsichtlich des Geschlechterverhältnisses festgestellt. Der Weibchenanteil wies bei den Versuchsgruppen mit 52,8% (12:1-Abwasserverdünnung) und 42,6% (2:1-Abwasserverdünnung) ebenfalls lediglich eine tendenzielle Abnahme im Vergleich zur Kontrolle mit 54,4% auf. Literaturangaben zufolge ist auch bei Krallenfröschen das Geschlecht genetisch determiniert (Mikamo und Witschi, 1964). Die phänotypische Ausbildung während der Larvalentwicklung ist jedoch ebenfalls hormonabhängig (Chang und Witschi, 1955b, c, Gallien, 1954, 1955, 1956, 1962, Kloas et al. 1999). Die niedrigste effektive \bullet -Estradiol-Konzentration, die zu einer Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der weiblichen Tiere führte, lag bei 3 μ g/l (Kloas et al. 1999) und somit deutlich über den in dieser Untersuchung vorliegenden Konzentrationen. Die für *Xenopus laevis* nachgewiesene feminisierende Wirkung von Nonylphenol und Octylphenol zeigte sich ebenfalls erst bei Konzentrationen (22 μ g NP/l und 2 μ g OC/l), die um ein vielfaches die in Würm und Kläranlagenauslauf gemessenen Konzentrationen überschritten. Somit erscheint auch bei *Xenopus laevis* ein kausaler Zusammenhang zwischen einem höheren Weibchenanteils sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der 12:1-Versuchsgruppe und der höheren Alkylphenolbelastung des Würmwassers (1 μ g OP/l, 0,2 μ g OP/l) während des kurzen Zeitraums zu Beginn des Versuchs eher unwahrscheinlich. Beide Froscharten wiesen bei der histologischen Untersuchung des Gonadengewebes neben eindeutig männlich und weiblich differenzierten Tieren auch Hermaphroditen auf. Bei *Rana temporaria* zeigten sich zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich des Gesamtanteils von intersexuellen Gonaden mit 27,6% in der Kontrolle, 33,1% in der 12:1-Versuchsgruppe und 31% in der 2:1-Versuchsgruppe keine signifikanten Unterschiede. Da es sich bei Grasfröschen aus Niederungslagen um eine geschlechtlich semidifferenzierte Rasse handelt, bei welcher zunächst auch die genetisch männlich determinierten Tiere Ovarien entwickeln, welche dann über hermaphroditische Stadien in Hoden umgewandelt werden, wurden die Hermaphroditen

als natürlich vorkommende Intersex-Stadien bzw. Transformationsstadien gewertet. Diese Annahme wird bestätigt durch den geringen Anteil männlicher Grasfrösche, der bei den Würmwasser-exponierten Tieren bei 18% lag und in den Versuchsgruppen einen Anteil von 14,2% (12:1-Abwasserverdünnung) bzw. 26,4% (2:1-Abwasserverdünnung) aufwies. Literaturangaben zufolge wurde ein Auftreten von Hermaphroditen als Folge einer Hormonexposition erst bei einer Konzentration von 0,5 µg/l Estradiol beobachtet (Chang und Witschi, 1955c). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Hermaphroditen und der in vorliegender Studie äußerst geringen Östrogenexposition erscheint daher unwahrscheinlich. Eine Einteilung des Transformationsprozesses in drei Stadien ergab eine Verlangsamung des Transformationsprozesses bei den Abwasser-exponierten Tieren im Vergleich zur Würmwasser-Kontrollgruppe. Die Abwasser-exponierten Tiere wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe (7,9%) eine signifikante Zunahme der Hermaphroditen im Transformationsstadium I (12:1-Verdünnung: 26,2%, 2:1-Verdünnung: 35%) auf, woraus eine ebenfalls signifikante Abnahme des Anteils von Tieren im Transformationsstadium III bei den Versuchsgruppen (12:1-Verdünnung: 44%, 2:1-Verdünnung: 37%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (71,4%) resultierte. Das physiologische Auftreten von Hermaphroditen bei semidifferenzierten Rassen während der Metamorphose wurde ohne nähere Angaben zum Beginn des Transformationsprozesses beschrieben (Gallien, 1941). Literaturdaten zur Beeinflussung der Transformation bei *Rana temporaria* durch östrogenwirksame Substanzen liegen nicht vor. Die nur geringgradig höhere, jedoch kontinuierlichere •-Estradiol-Belastung des Abwassers im Vergleich zum Würmwasser, sowie die in der zweiten Hälfte des Versuchs höhere Belastung des Abwassers mit Alkylphenolen könnten eine Verlangsamung des Transformationsprozesses und damit auch der Umbildung von Eierstock- zu Hodengewebe verursacht haben. Es ist jedoch auch nicht gänzlich auszuschließen, dass eine Beschleunigung des Transformationsprozesses bei der Kontrollgruppe, bedingt durch die zu Beginn des Versuchs kurzfristig höhere Alkylphenolbelastung, vorgelegen hat. Diese Hypothese beruht darauf, dass, Literaturangaben zufolge, Nonylphenol in einigen Fällen zu einer Erhöhung der Testosteronspiegel führt. So wurde bei Nachkommen NP-exponierter Regenbogenforellen (1 µg NP/l, 10 µg NP/l) ein erhöhter Testosteronspiegel festgestellt (Schwaiger et al., 2002). Eine konzentrationsabhängige Hemmung der Ausscheidung von Glukose-konjugiertem Testosteron durch Alkylphenole wurde auch bei weiblichen Wasserflöhen (*Daphna magna*) beobachtet (Baldwin et al., 1997).

Bei den Krallenfröschen fanden sich sowohl bei Individuen der Würmwasser-Kontrollgruppe als auch bei den Abwasser-exponierten Tieren intersexuelle Gonaden. Der Anteil war bei der Kontrolle mit 4,2% am höchsten, gefolgt von der 2:1-Abwasserverdünnung mit 1,9% und der 12:1-Abwasserverdünnung mit 0,8%. Im Gonadengewebe der Hermaphroditen, welches einen primär männlichen Charakter, das heißt eine tubuläre Struktur, somatische Zellen,

Spermatogonien und zum Teil bereits Spermatozyten zeigte, waren vereinzelt ein oder mehrere Oozyten zu finden. Das temporäre Auftreten von Oozyten im Hodengewebe juveniler Krallenfrösche wurde in der Literatur ohne nähere Angabe zu Ursache und Häufigkeit beschrieben (Gallien, 1974). In älteren Veröffentlichungen wurde das Auftreten intersexueller Gonaden mit einer Hormonexposition der Tiere in Zusammenhang gebracht (Gallien, 1956, 1962). Bei Versuchen zur östrogen Wirkung von Alkylphenolen ist das Auftreten von Hermaphroditen bei *Xenopus laevis* bisher nicht beschrieben worden (Kloas et al., 1999). Jedoch wurde die Geschlechtsbestimmung hier nicht lichtmikroskopisch, sondern mit Hilfe eines Stereomikroskops durchgeführt, wodurch intersexuelle Gonaden möglicherweise nicht erkannt wurden. Wenngleich nicht signifikant unterschiedlich, weisen in vorliegender Studie die in Würmwasser exponierten Tiere den höchsten Prozentsatz an Hermaphroditen auf. Ein Zusammenhang mit der kurzfristig aufgetretenen Belastung der Würm mit Alkylphenolen (Maximalwerte von 1 µg NP/l und 0,2 µg OP/l) während der Geschlechtsdifferenzierung ist nicht auszuschließen. Eine 1-Jahres-Exposition von Regenbogenforellen ab dem Eistadium (1 und 10 µg NP/l) ergab allerdings, trotz der deutlich höheren Konzentration von Nonylphenol, im Vergleich zu den kurzzeitig gemessenen Spitzenwerten des Würmwassers, ebenfalls keine signifikante Zunahme der Hermaphroditen (Ackermann et al., 2002).

Einige der untersuchten weiblichen Gonaden wiesen eine gering- bis mittelgradige Oozytendegeneration auf. Diese Degenerationserscheinungen wurden bei Grasfröschen und Krallenfröschen sowohl in der Würmwasser-Kontrolle als auch in den zwei Versuchsgruppen beobachtet. Ebenso wie bei Säugetieren (Weiss und Käufer-Weiss, 1999) kommen auch bei Amphibien (Lofts, 1974) nicht alle Follikel zur Ovulation, sondern werden zum Teil zurückgebildet (Follikelatresie). Bei Fischen beispielsweise können verstärkte Degenerationserscheinungen im Bereich der Oozyten auch durch ungünstige Umweltbedingungen (Wassertemperatur, Tageslichtlänge, Sauerstoff- und Salzkonzentration) oder Stoffwechselstörungen hervorgerufen werden (Hibiya, 1982). Dass es sich bei der Oozytendegeneration der Grasfrösche um Anzeichen eines beginnenden Transformationsprozesses handelt, ist auszuschließen, da das hierfür typische Merkmal, eine beginnende Einwanderung von Medullargewebe, fehlt. Ebenfalls gegen einen einsetzenden Transformationsprozess spricht, dass derartige Degenerationserscheinungen auch bei etwa gleichaltrigen weiblichen Tieren einer geschlechtlich differenzierten Population (Gruppe IIIa) beobachtet wurden. Tiere der Gruppe II, welche aus einem unbelasteten Habitat im Freiland entnommen wurden, wiesen im gleichen Umfang Degenerationserscheinungen auf, so dass diese nicht als Abwasser-bedingte Veränderungen, sondern im Sinne einer physiologischen Follikelatresie interpretiert werden. Zwei männliche Krallenfrösche der 2:1-Versuchsgruppe wiesen ebenfalls Veränderungen des Gonadengewebes auf. So waren in einigen Bereichen der Hoden fast ausschließlich somatische Zellen zu beobachten. Spermatogonien waren nur in sehr geringer Anzahl vor-

handen und zeigten Degenerationserscheinungen. Infolge eines vollständigen Abbaus von Keimzellen waren Hohlräume im Gonadengewebe entstanden. Derartige Veränderungen des Hodengewebes waren bei männlichen Grasfröschen nicht zu beobachten. Da diese ausgeprägten Degenerationserscheinungen nur bei zwei männlichen Tieren von insgesamt 53 der 2:1-Versuchsgruppe zu finden waren, ist ein Einfluss des Abwassers relativ unwahrscheinlich. Ein weiblicher Krallenfrosch der 2:1-Versuchsgruppe wies im Ovarialgewebe Bereiche auf, in welchen eine große Zahl an somatischen Zellen, Bindegewebe und einige degenerierende Keimzellen erkennbar waren. In den „normal“ entwickelten Ovarien juveniler Tiere fanden sich hingegen neben Oozyten und Follikelzellen keine weiteren somatischen Zellen und nur sehr wenig interzelluläres Bindegewebe. Da nur ein Tier dieser Versuchsgruppe die beschriebenen Veränderungen zeigte, werden diese als Spontanbefunde und nicht als Folge einer Abwasserexposition gewertet. Bei einem großen Teil der Krallenfrösche und Grasfrösche aller Gruppen wiesen die Ovarien ein oder mehrere herdförmige lymphozytäre Infiltrate auf, welche im Sinne einer unspezifischen Entzündungsreaktion zu interpretieren sind.

*D Semiquantitative Bestimmung der Vitellogenin-mRNA bei *Xenopus laevis**

Bei der semiquantitativen Bestimmung der Vg-mRNA aus Leberproben von *Xenopus laevis* mittels RT-PCR zeigte sich bei den weiblichen Tieren der 2:1 Abwasserverdünnung eine schwach signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Vg-mRNA-Level von Proben männlicher Tiere hingegen ließen keine Unterschiede zur Kontrolle erkennen. Bisher erfolgte der Nachweis einer Stimulierung der Vg-mRNA bei Krallenfröschen ausschließlich in vitro an Hepatozytenzellkulturen (Kloas et al. 1999). Dabei wurde eine dosisabhängige Induktion der Vitellogenin-mRNA nach 72 stündiger Inkubation mit verschiedenen östrogenen Substanzen hervorgerufen. Die Konzentrationen, welche eine Induktion der Vg-mRNA auslösten, lagen jedoch deutlich über den in vorliegendem Versuch im Abwasser gemessenen Nonylphenol- und \bullet -Estradiol Konzentrationen. So konnte bei \bullet -Estradiol ab einer Konzentration von 10^{-9} Mol ($\bullet 0,3\mu\text{g}$), bei Nonylphenol ab 10^{-8} Mol ($\bullet 2\mu\text{g}$) ein Anstieg des Vg-mRNA-Levels registriert werden. Bei einer Untersuchung an Regenbogenforellen wurde nach Exposition in $1\mu\text{g}$ Nonylphenol/l eine erhöhte Vitellogeninkonzentration im Blutplasma festgestellt (van der Heyde, 2000). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der vermehrten Vg-mRNA Induktion bei den weiblichen Krallenfrösche und der relativ geringen Belastung des Abwasser mit östrogenwirksamen Substanzen ist jedoch nicht auszuschließen, da eventuell auftretende synergistische Effekte der östrogenen Substanzen berücksichtigt werden müssen. Synergistische Effekte östrogenen Stoffe wurden bereits in anderen Untersuchungen nachgewiesen. So zeigten Fische bei einer gleichzeitigen Behandlung mit mehreren

östrogen wirksamen Umweltchemikalien einen Vitellogeninanstieg im Blutplasma, wohingegen eine Behandlung mit Einzelstoffen keinen Effekt hervorrief (Celius et al., 1997).

D histopathologische Befunde anderer Organe

Die histopathologische Untersuchung zur Erfassung möglicher toxischer Effekte des Kläranlagenabwassers ergab für beide Froscharten Organveränderungen im Bereich von Leber und Niere. Die Art der Läsionen und das Auftretensmuster erwiesen sich jedoch als unterschiedlich. Die Ergebnisse liefern keine Hinweise auf eine mögliche toxische Wirkung des Abwassers. Zwar stellen die in der Niere beobachteten Veränderungen wie Tubuluszelluntergänge und eine Dilatation von Tubuli durchaus Läsionen dar, die im Rahmen einer Schadstoffbelastung zum Beispiel bei Fischen beschrieben wurden (Schwaiger et al., 1996; Schwaiger, 2001), jedoch ließen Krallenfrösche, die dem Abwasser in einer hohen Verdünnung von 12:1 ausgesetzt waren, massivere Organveränderungen erkennen als Tiere aus dem Versuchsansatz mit höher konzentriertem Abwasser (2:1). Im Falle der Grasfrösche waren die deutlichsten histopathologischen Veränderungen in Form einer Erweiterung der Lebersinuus mit damit einhergehenden Leberzellnekrosen bei Würmwasser-exponierten Kontrolltieren nachweisbar. Es ist zu vermuten, dass sowohl der bei beiden Froscharten beobachtete variierende Speicherstatus des Lebergewebes (Glykogen), als auch die ausschließlich bei Krallenfröschen des 12:1-Verdünnungsansatzes auftretende großtropfige Vakuolisierung von Hepatozyten, welche im Sinn einer fettigen Leberdegeneration interpretiert wird, auf die experimentellen Haltungsbedingungen und das damit verbundene artifizielle Nahrungsangebot zurückzuführen ist. Die sowohl bei Grasfröschen des Kontrollselektives als auch bei Abwasser-exponierten Tieren auftretenden Granulom-artigen Gebilde in der Niere stellen aller Wahrscheinlichkeit nach dezent verkalkte Bohrgänge parasitären Ursprungs dar.

*Vergleich *Rana temporaria* - *Xenopus laevis*: experimentalpraktische Aspekte und Reaktionsweisen*

Der Expositionsversuch wurde vergleichend mit *Rana temporaria*, als Vertreter einer einheimischen Froschart und dem afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* durchgeführt. Der Krallenfrosch ist ein gut dokumentiertes Versuchstier, welches eine rein aquatische Lebensweise aufweist. Ein experimentalpraktischer Vorteil ist, dass man bei Versuchen mit dieser Froschart, im Gegensatz zu den heimischen Grasfröschen, nicht saisonal gebunden ist, da die Laichablage mittels humanem Choriongonadotropin ganzjährig induziert werden kann. Durch die Züchtung im Labor findet zudem der Artenschutzaspekt Berücksichtigung. Bei der Versuchsdurchführung erwies sich die Fütterung der subadulten Krallenfrösche mit Larven als deutlich einfacher im Vergleich zur Fütterung der Grasfrösche mit Wiesenplankton. Als

nachteilig erwies sich die vergleichsweise hohe Stressanfälligkeit der Krallenfrosch-Larven, die mit einer hohen Mortalität einherging, sowie die kannibalische Lebensweise nach Abschluss der Metamorphose, welche eine Einzeltierhaltung notwendig machte.

Bei beiden Froscharten waren keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Entwicklung, der Gonadenreifung sowie des Geschlechterverhältnisses durch die Abwasserexposition erkennbar. Sie waren somit in ihrer Reaktion vergleichbar. Die im Versuch eingesetzte geschlechtlich semidifferenzierte einheimische Grasfroschpopulation wies durch das Stattfinden von Transformationsprozessen ein zusätzliches Kriterium auf, welches eine differenziertere Betrachtung zuließ. Eine signifikante Verlangsamung dieses Prozesses bei den Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe weist daraufhin, dass dieser Prozess möglicherweise bereits durch geringe Konzentrationen östrogenen Stoffe beeinflusst wird und dadurch ein sensiblen Indikator für östrogene Belastungen darstellt. Bei Krallenfröschen wurde das Auftreten von Hermaphroditen ohne Angabe von Häufigkeit und Ursache beschrieben (Gallien, 1974). In anderen Veröffentlichungen wurden intersexuelle Gonaden mit einer Hormonexposition in Verbindung gebracht (Gallien, 1956, 1962). Generell waren hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens intersexueller Gonaden weder bei Gras- noch bei Krallenfröschen signifikante Unterschiede zwischen Abwasser-exponierten und Kontrolltieren zu beobachten, so dass diesbezüglich von einer ähnlichen Reaktionsweise auszugehen ist. Eine Messung der Vg-mRNA wurde nur bei *Xenopus laevis* durchgeführt, so dass kein Vergleich möglich ist.

Beurteilung der Ergebnisse im Hinblick auf eine mögliche Gefährdung von Amphibien

Die im untersuchten Oberflächengewässer und dem Kläranlagenauslauf vorgefundene Belastungssituation mit östrogenwirksamen Substanzen ist vergleichbar mit anderen, in Deutschland ermittelten Konzentrationen und als eher gering einzustufen. Die Konzentrationen östrogenwirksamer Stoffe lagen deutlich unter Vergleichswerten anderer europäischer Länder. Anhand der Untersuchungsergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die aktuelle östrogene Belastung in den Versuchsgewässern keine Gefährdung für Amphibienpopulationen darstellt. Die erhöhten Vg-mRNA Werte in der Leber weiblicher Krallenfrösche, welche in einer Abwasserverdünnung von 2:1 exponiert wurden, sprechen für eine gewisse östrogene Potenz des Abwassers im Vergleich zum Würmwasser. Allerdings war diese geringgradige biochemische Reaktion nicht von populationsrelevanten Veränderungen wie einer Verschiebung des Geschlechterverhältnisses oder einem erhöhtem Auftreten von Hermaphroditen begleitet.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung und Bewertung der Belastung eines süddeutschen Gewässers mit östrogenwirksamen Stoffen oberhalb und unterhalb eines Kläranlagenablaufs und deren mögliche Auswirkung auf die Gonadenentwicklung von Amphibien. In einem Expositionsversuch wurde die Wirkung unterschiedlicher Abwasserverdünnungen auf einheimische Grasfrösche (*Rana temporaria*) mit jenen auf den südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) verglichen. Zunächst wurden aufgrund der geringen Datenlage in der aktuellen Literatur Basisdaten zur Lichtmikroskopie, Ultrastruktur und Immunhistochemie bei Fröschen erhoben. Weiterhin wurde bei zwei Populationen unterschiedlicher Herkunft eine vergleichende histologische Betrachtung der Geschlechtsdifferenzierung vorgenommen.

Charakterisierung der Gonaden

Die Ovarien der Krallenfrösche wiesen eine girlandenartige Struktur auf, wohingegen die der Grasfrösche kompakt waren. Die Ovarien beider Froscharten waren von einem Epithel umgeben und mit Keimzellen ausgefüllt. Diese umschlossen eine zentral gelegene Ovarialhöhle. Die Oogonien fanden sich in den peripheren Bereichen des Organs. Die Oozyten waren durch einen großen, unregelmäßig geformten Kern mit peripher liegenden Nukleoli gekennzeichnet und wurden von einer einschichtigen, flachen Follikelzellschicht umgeben. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Grasfroschovarien zeigten sich im Zytoplasma lang-gestreckte Mitochondrien vom tubulären Typ, welche ausschließlich bei weiblichen Keimzellen zu finden waren. Bei den Oozyten der subadulten Tiere enthielten einige der Mitochondrien Dotterkristalle. Weiterhin fiel bei den weiblichen Keimzellen eine Ansammlung elektronendichter Granula unterhalb der Plasmamembran auf, bei welchen es sich um eine Vorstufe der Kortikalgranula handeln könnte.

Die Hoden der Frösche wurden von einem Epithel und einer Tunica albuginea umhüllt und ließen bereits eine tubuläre Struktur erkennen. Die Hoden der Gras- und Krallenfrösche unterschieden sich durch ihren Entwicklungsgrad. Während sich bei den juvenilen Grasfröschen ausschließlich Spermatogonien fanden, ließen einige der afrikanischen Krallenfrösche bereits Spermatozyten und Spermatozoen erkennen. Die für Froschhoden typischen Keimzysten konnten erst mit dem Auftreten von Spermatozyten beobachtet werden. Lichtmikroskopisch konnten bei beiden Froscharten zwei unterschiedliche Typen von Spermatogonien unterschieden werden, bei welchen es sich vermutlich um primäre und sekundäre Spermatogonien handelt. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Grasfroschhoden konnten die somatischen Zellen, aufgrund ihrer Lage und Morphologie, deutlich in die innerhalb der Tubuli seminiferi gelegenen Zellen, welche vermutlich eine ähnliche Funktion über-

nehmen wie die Sertolizellen der Säugetiere und die außerhalb gelegenen Leydig'schen Zwischenzellen, deren auffälligsten Charakteristikum die Granularvesikel im Zytoplasma waren, differenziert werden.

Im Hinblick auf die Geschlechtsdifferenzierung von *Rana temporaria* erfolgte eine vergleichende histologische Untersuchung der Gonaden von juvenilen und subadulten Fröschen einer beheimateten Mittellandpopulation und einer hochalpinen Population. Die Mittellandpopulation erwies sich als geschlechtlich semidifferenzierte Rasse, die neben eindeutig männlich oder weiblich differenzierten Tieren auch intersexuelle Individuen in unterschiedlichen Stadien des Transformationsprozess erkennen ließ. Bei diesen Tieren entwickeln zunächst auch genotypisch männliche Individuen weibliche Gonaden, die sich dann über ein Hermaphroditenstadium in Hoden umwandeln. Der Transformationsprozess der weiblichen in männliche Gonaden wurde anhand von morphologischen Kriterien in drei Stadien eingeteilt. Bei der hochalpinen Population handelte es sich um eine geschlechtlich differenzierte Rasse.

An Gonadengewebe von juvenilen und subadulten Grasfröschen wurden mittels der Avidin-Biotin-Komplextchnik fünf verschiedene Antikörper ausgetestet. Die Untersuchung auf Laminin, ein nicht kollagenes Glykoprotein, welches ein Bestandteil der Basalmembran bei Säugern ist, ergab eine positive Reaktion. Somit scheint auch in der Basallamina von Fröschen ein dem Laminin der Säugetiere strukturell ähnliches Glykoprotein eine wichtige Rolle zu spielen. •-Aktin, ein Faserprotein der glatten Muskulatur, welches bei verschiedenen Spezies in der Theka externa der Follikelzellschicht nachgewiesen wurde, konnte bei den untersuchten Froschgonaden ausschließlich in Gefäßwänden, also nicht in der Follikelzellschicht, nachgewiesen werden. Desweiteren wurde das Vorkommen einer Zona pellucida unter Anwendung von Antikörpern gegen das porcine Glykoprotein ZP3 untersucht. Die Eizelle inklusive der sie umgebenden Follikelzellschicht reagierten negativ, was jedoch das Vorhandensein einer Glykoproteinschicht anderer Antigenität nicht ausschließt. Eine Glykoproteinschicht bei Anuren wurde bisher jedoch von keinem Autor im Zusammenhang mit der mikroskopischen Anatomie der Ovarien von *Rana temporaria* oder anderen Froscharten erwähnt. Die Untersuchung des Gonadengewebes im Bezug auf das Vorkommen von ACE (Angiotensin-Converting-Enzyme) verlief ebenfalls negativ.

Anwendungsbeispiel

Mit Ausnahme der zu Beginn des Versuchs kurzzeitig aufgetreten höheren Alkylphenolbelastung des Würmwassers, ergaben die chemisch-analytischen Untersuchungen des Expositionswassers insgesamt eine als gering anzusehende Belastung mit östrogen wirksamen Substanzen. Die gemessenen Konzentrationen waren mit anderen Daten aus deutschen Gewässern vergleichbar und lagen deutlich unterhalb europäischer Vergleichswerte. Anhand

der Untersuchungsergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die aktuelle Belastung des Versuchsgewässers keine Gefährdung für Amphibienpopulationen darstellt.

Die Untersuchung ergab keinen Einfluss des Abwassers auf die Embryonal- und Larvalentwicklung. Ebenso konnten bei der histologischen Beurteilung des Gonadengewebes von exponierten und Kontrollfröschen hinsichtlich der gonadalen Geschlechtsdifferenzierung sowie der Geschlechterverhältnisse keine signifikante Veränderungen festgestellt werden. Die Häufigkeit des Auftretens von intersexuellen Individuen wies, sowohl im Falle der Krallenfrösche als auch bei Grasfröschen, keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe auf. Lediglich der Transformationsprozess von Ovarien zu Hoden der im Versuch eingesetzten, geschlechtlich semidifferenzierten Grasfroschpopulation zeigte eine Verlangsamung bei den Abwasser-exponierten Tieren im Vergleich zur Würmwasser-Kontrollgruppe. Ursächlich könnte dies auf einen hemmenden Einfluss, der zwar nur in geringen Konzentrationen jedoch kontinuierlicher vorhandenen östrogenen Substanzen im Abwasser, zurückzuführen sein. Umgekehrt lässt sich auch eine Beschleunigung des Transformationsprozesses bei der Kontrollgruppe durch die zu Beginn des Versuchs kurzfristig höher Nonylphenolbelastung nicht ganz ausschließen, da Nonylphenol, Literaturangaben zufolge, zu einer Erhöhung des Testosteronspiegels führen kann.

Die vom Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei in Berlin durchgeführte semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Vitellogenin-mRNA ergab eine schwach signifikante Zunahme bei den weiblichen Tieren, die dem Abwasser in einer Verdünnung von 2:1 ausgesetzt waren, im Vergleich zu Kontrollgruppe. Unter Berücksichtigung synergistischer Effekte östrogenen Substanzen, könnte der Anstieg auf die insgesamt etwas höhere Belastung des Abwassers zurückzuführen sein. Die durchgeführte histopathologische Untersuchung zur Erkennung toxischer Effekte von Abwasserinhaltsstoffen sowie anderer potentieller Einflussfaktoren lieferte keine Hinweise auf eine mögliche toxische Wirkung des Abwassers.

7. Summary

The influence of estrogen-like substances on the gonadal development in frogs (*Rana temporaria* and *Xenopus laevis*). Ultrastructural and immunohistochemical investigations on the gonads of frogs (*Rana temporaria*).

The aim of the present thesis was the investigation and assessment of the estrogen pollution of a river in South-Germany above and below a sewage plant outlet and its possible effects on the gonadal development in amphibians. In an exposure experiment with different sewage dilutions the effect on the indigenous grass frog (*Rana temporaria*) were compared with the effects on the African claw frog (*Xenopus laevis*). Because of the lack of relevant data in current literature it was necessary to first collect some basic data on light microscopy, ultrastructure and immunohistochemistry with reference to frogs.

Furthermore the sexual differentiation of two populations of different origin were compared histologically.

Characterisation of the gonads

The ovaries of *Xenopus laevis* displayed a garland-like structure in contrast to the compact ovaries of *Rana temporaria*. The ovaries of both frog species were surrounded by an epithelium and filled with germ cells which enclosed an ovarian cavity. The oögonies were mainly found in the peripheral parts of the organ. The oocytes were characterised by a big and irregularly shaped cell nucleolus with peripherally located nucleoli. They were surrounded by a thin one-layered follicular epithelium. Electron microscopical examination of the ovaries of *Rana temporaria* showed elongated tubular mitochondria in the cytoplasm which were found exclusively in oocytes. Some of the mitochondria from subadult frogs contained yolk crystals. Additionally an accumulation of electron-tight Granule was found just below the plasma membrane, which could be a preliminary stage of the cortical granule.

The testis of the frogs were enveloped by an epithelium and a tunica albuginea which already showed a tubular structure. The testis from *Rana temporaria* and the *Xenopus laevis* differed in their developmental stages. The testis of juvenile *Rana temporaria* contained only germ cells whereas the testis of some *Xenopus laevis* already contained spermatocytes and spermatozoa. The spermatocysts, characteristic of frog testis, could be seen in conjunction with the appearance of spermatocytes only. By using light microscopy two different types of germ cells in both frog species could be distinguished which probably were primary and secondary germ cells. By electron microscopical investigation of the testis of *Rana tempo-*

raria the somatic cells could, on the basis of location and morphology, be differentiated in two types. The somatic cells of the first type were located inside the Tubuli seminiferi and have probably the same function as the Sertoli cells of mammals. The cells of the second type, the Leydig cells or interstitial cells, were located outside the Tubuli and were characterized by granular vesicle in the cytoplasm.

With view to the sexual differentiation of *Rana temporaria* a comparative histological investigation of the gonads of juvenile and subadult frogs of a native midland population and a high alpine population was performed. The midland population proved to be a sexually semi-differentiated species since apart from clearly male or female animals it also comprises intersex individuals in different stages of the transformation process. The genotypically male animals developed female gonads in the first place which secondly converted into testis during a hermaphrodite stage. The transformation process from female into male gonads was, on the basis of morphological criteria, classified into three stages. The highalpin population on the other hand proved to be a sexually differentiated race.

By using the Avidin-Biotin-Complex-Technique five different antibodies were tested on the gonadal tissue of juvenile and subadult *Rana temporaria*. The test for Laminin, a non-collagen glycoprotein, which is part of the basal membrane in mammals, resulted in a positive reaction. It seems therefore that similar to Laminin in mammals a glycoprotein plays an important part in the basal membrane of frogs. • -Actin, a fibrous protein of the smooth muscles, which was detected in the Theca externa of the layer of follicle cells in different species, could be established in the blood vessel wall only and not in the layer of follicle cells. Furthermore the occurrence of a Zona pellucida by using antibodies against the porcine glycoprotein ZP3 was investigated. The ovum including the surrounding layer of follicle cells showed a negative reaction which however did not implicitly exclude the occurrence of a glycoprotein layer with a different antigenicity. Until now the existence of a glycoprotein layer in anurans, in connection with microscopical anatomy of ovaries in *Rana temporaria* or other species of frogs has not been mentioned in references. The examination of the gonadal tissue as to the occurrence of ACE (Angiotensin Converting Enzymes) turned out negative as well.

Example of application

With the exception of a temporarily higher concentration of alkylphenol in the beginning of the exposure, the chemical analyses revealed a relatively low degree of pollution with alkylphenols and steroids. The results were comparable to other results of German rivers and stayed well below other European comparative data. According to the results of this study the current level of pollution of the experimental water with estrogens does not endanger the amphibian population. The examination did not reveal any influence of the sewage on the

embryonal and larval development. Furthermore, the histological investigation of the gonads in exposed and unexposed frogs with reference to the gonadal sexual differentiation as well as the sex ratios did not reveal significant changes. There was no correlation as to the frequency of the occurrence of intersex in the groups of exposed and unexposed frogs, neither of *Xenopus laevis* nor of *Rana temporaria*. Only the transformation process from ovaries to testis of the sexually semi-differentiated species of *Rana temporaria* was slowed down in the group of exposed animals in contrast to unexposed animals. The reason for this phenomenon could be the inhibitive influence of the low-level but more continuous estrogen pollution in sewage than in river water. Conversely, a link between the acceleration of the transformation process within the group of unexposed animals and the temporarily higher alkylphenol level in the beginning of the exposure cannot completely be ruled out. According to references alkylphenol can cause an increase of testosterone.

The semiquantitative RT-PCR detecting Vitellogenin-mRNA carried out by the Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries in Berlin showed a minor increase in females of *Xenopus laevis* which were exposed to sewage in the ration of a 2:1 dilution in contrast to the unexposed animals. Taking into account the synergistic effects of estrogens, the increase could be attributed to the higher estrogen pollution of the sewage. The histopathological analysis for the detection of toxic effects of the sewage as well as other potential influential factors provided no hints as to a possibly toxic influence of the sewage.

8. Literaturverzeichnis

ACKERMANN, G.; SCHWAIGER, J., NEGELE, R. D.; FENT, K. (2002) Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogen exposure in juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, im Druck

AHEL, M., GIGER, W., (1993a) Aqueous solubilità of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* **26** (8), 1461-1470

AHEL, M., GIGER, W., (1993b) Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* **26** (8), 1471-1478

AHEL, M., GIGER, W., KOCH, M. (1994a) Behaviour of alkylphenol polythoxylates surfactants in the aquatic environment – I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* **28** (5), 1131-1142

AHEL, M., GIGER, G., SCHAFFNER, C. (1994b) Behaviour of alkylphenol polyethoxylates surfactants in the aquatic environment – II. Occurrence and transformation in rivers. *Wat. Res.* **28**, 1143-1152

AHEL, M., HRSK, D., GIGER, W. (1994c) Aerobic transformation of short-chain alkylphenol polyethoxylates by mixed bacterial cultures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **26**, 540-548

AMSTERDAM, A.; LINDNER, H. R.; GRÖSCHEL-STEWART, U. (1977) Localization of actin and myosin in the rat oocyte and follicular wall by immunofluorescence. *Anat. Rec.* **187**, 311-328

ANKLEY, G., MIHAICH, E., STAHL, R., TILLIT, R., COLBORN, T., MC MASTER, S., MILLER, R., BANTLE, J., CAMPBELL, P., DENSLOW, N., DICKERSIN, R., FOLMAR, L., FRY, M., GIESY, J., EARL GREY, L., GUINEY, P., HUTCHINSON, T., KENNEDY, S., KRAMER, V., LEBLANG, G., MAYES, M., NIMROD, A., PATINO, R., PETERSON, R., PURDY, R., RINGER, R., THOMAS, P., TOUART, L., KRAAK, G. VAN DER, ZACHAREWSKI, T. (1998) Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem.* **17** (1), 68-87

- ANSARI, A. Q., DOLPHIN, P. J., LAZIER, C.B., MUNDAY, K. A. , AKTHAR, M. (1971) Cemi-cal composition of an oestrogen-induced calcium-binding glycolipophosphoprotein in *Xenopus laevis*. *Biochem. J.* **122**, 107-113
- ASHFIELD, L. A., POTTINGER, T. G., SUMPTER, J. P. (1998) Exposure of female juvenile rainbouw trout to alkylphonolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. *Environ. Toxicol. Chem.* **17** (3), 679-686
- BAILLIE, A. H., FERGUSON, M. M., HART, D. Mc. K. (1966) "Developments in Steroid Histochemistry" *Academic Press*, New York
- BALDWIN, W. S., GRAHAM, S. E., SHEA, D., LEBLANC, G. A. (1997) Metabolic androgeni-zation of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-Nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1905-1911
- BARR, W. A. (1968) Patterns of ovarian activity. In Barrington E. J. W., Jörgensen C. B. "Perspectives in Endocrinology: Hormones in the Liver of lower Vertebrates. 164-238, *Academic Press*, New York
- BARTH, L. G., BARTH, L. J. (1954) "The Energetic of Development." Columbia Univ. Press, New York
- BENSON, B., SORRENTINO, S., EVANS, J. S. (1969) Increase in serum FSH following unilateral ovariectomy in the rat. *Endocrinology* **84**, 369-374
- BENSON, W. H., NIMROD, A. C. (1998) Reproduction and development of Japanese medaka following an early stage exposure to xenoestrogens. *Aquat. Toxicol.* **44** (1-2), 141-156
- BECK, K.; HUNTER, J.; ENGEL, J. (1990) Structure and function of laminin: anatomy of multidamain glycoprotein. *FASEB* **4**, 148-160
- BLAUSTEIN, A. (1994) Amphibian in a bad light. *Natural History* **10**, 32-39
- BLACKBURN, M. A.; WALDOCK, M. J. (1995) Concentrations of alcyphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res.* **29**, 1623-1629

- BLAB, J. (1978) Untersuchungen zur Ökologie, Raum-Zeit-Einbindung und Funktion von Amphibienpopulationen. *Schr.-R. Landschaftspflege Naturschutz* **18**, 1-146
- BON, E., BARBE, U., NUNEZ RODRIQUEZ, J., CUISSET, B., PELLISERO, C., SUMPTER, J. P., MENN, F. LE (1997) Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Establishment and validation of an ELISA. *Comp. Biochem. Physiol.* **117B** (1), 75-84
- BREUER, H. (1969) Biosynthesis and metabolism of steroid hormones in amphibians. In „Progress in Endocrinology.“ (C. Gual, Ed.) , 738-747, *Excerpta Medica Foundation, Amsterdam*
- BRÖKELMANN, J. (1964) Über die Stütz- und Zwischenzellen des Froschhodens während des spermatogenetischen Zyklus. *Z. Zellforsch.* **64**, 429-461
- BUA (1988) Nonylphenol. BUA-Stoffbericht 13 (Januar 1988), Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg.), Frankfurt/M.
- BULL, J. J. (1980) Sex determination in reptiles. *Quart. Rev. Biol.* **55**, 3-21
- BURGOS, M. H., VITALE-CALPE, R. (1967) The mechanism of spermiation in the toad. *Amer. J. Anat.* **120**, 227-252
- BURGOS, M. H., VITALE-CALPE, R., RUSSO, J. (1968) The effect of LH in the seminiferous tubules at the subcellular level. In “Gonadotropins 1968” (E. Rosemberg, ed.), 213-224, *Geron-X, Los Altos. California*
- CARSON, R. (1968) Der stumme Frühling [1962] München, 1968
- CARNEVALI, O., MOSCONI, G. (1992) In vitro induction of vitellogenin synthesis in *Rana esculenta*: role of pituitary. *General Comp. Endocrinol.* **86**, 352-358
- CEDARD, L., OZON, R. (1962) Teneur en œstrogènes du sang de la grenouille rousse (*Rana temporaria* L.) *C. R. Soc. Biol.* **156**, 1805-1806 Zitiert nach Lofts, B. (1974): “Reproduction”, in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, *Academic Press*, New York, London, 107-208

CELIUS, T.; ARUKWE, A., WALTHER, B. T.; GOKSOYR, A. (1997) Salmon (*Salmo salar* L.) treated with combined environmental chemicals. 7th Annual Meeting of SETAC-Europe, Amsterdam, The Netherlands, April 6-10, 1997. Abstract Book, G5-3.4

CESIO (1997) Position paper and question and answers on alkylphenol ethoxylates and hormonal effects. Comité Européen des Agents de Surface et leurs Intermédiaires Organiques, Brussels

CHAMPY, C. (1913) Recherches sur la spermatogenèse des batraciens et les éléments accessoires du testicule. *Arch. Zool. Exp. Gen.* **52**, 13-304
Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) Physiology of the Amphibia. Vol. II, *Academic Press*, New York, London, 107-208

CHANG, C.-Y., WITSCHI, E. (1955a) Breeding of sex-reversed males of *Xenopus laevis* Daudin. *Soc. Exp. Biol.* **89**, 150-151

CHANG, C.-Y., WITSCHI, E. (1955b) Genic and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **93**, 140-144

CHANG, C.-Y., WITSCHI, E. (1955c) Independence of adrenal hyperplasia and gonadal masculinization in the experimental adrenogenital syndrome of frogs. *Endocrinology*, **56**, 597-605

CHRISTENSEN, K. (1930) Sex differentiation and development of oviducts in *Rana pipiens* *Am. J. Anat.* **45**, 159-187

CHRISTENSEN, A. K. (1965) Testicular fine structure in the California slender salamander during the postnuptial regression of the testis. *Amer. Zool.* **5**, 678-679

CHRISTENSEN, A. K., FOWCETT, D. W. (1966) The fine structure of testicular interstitial cells in mice. *Amer. J. Anat.* **118**, 551-572

CHRISTENSEN, A. K., GILLIM, S. W. (1969) The correlation of fine structure and function in steroid-secreting cells with emphasis on those of the gonads. In: McKERNS, K.W. (Ed.) "The Gonads". pp.415-488. North Holland, Amsterdam

- CHRISTIANSEN, T., KAARKSGAARD B., JESPERSEN, A. (1998) Effects of nonylphenol and 17 β -oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. *The Journal of Experimental Biology*, **201**, 179-192
- COLBORN, T., DAVIDSON, A., GREEN, S. N., HODGE, R. A., JACKSON, C. I., LIROFF, R. A. (1990) Great Lakes, Great Legacy? *Washington D. C.: The Conservation Foundation. WWF*
- COLBORN, T. (1991) Global implications of Great Lakes wildlife research. *Internat. Environm. Affairs* **3**, 3-25
- COLERANGLE, J. B., ROY, D. (1996) Exposure of environmental estrogenic compound nonylphenol to noble rats alters cell-cycle kinetics in the mammary gland. *Endocrine* **4**, 115-122
- COPELAND, P. A., SUMPTER, J. P., WALKER, T. K., CROFT, M. (1986) Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* **83 B** (2), 487-493
- DALE, E., DORFMANN, R. I. (1967) Conversion of progesterone-4-¹⁴C to testosterone by testicular tissue of the american bullfrog. *Gen. Comp. Endocrinol.* **9**, 313-318
- De KORT, E. J. M. (1971) Het Interstitium testis bij de groene kikker, *Rana esculenta*: Een histometrisch en histochemisch onderzoek. Grafisch Bedrijf Fa. Lammers en Zn., Terborg
Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208
- DOBRINSKI, I, IGNOTZ, G. G., FAGNAN, M.S., YUDIN, A. I., BALL, B. A. (1997) Isolation and characterization of a protein with homology to angiotensin-converting enzyme from the periacrosomal plasma membrane of equine spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **48**, 251-260
- DODD, J. M. (1960) Gonadal and gonadotropic hormones in lower vertebrates
In „Mashall's Physiology of Reproduction“ (A.S. Parkes, ed.) Vol.1, part 2, 417-582, *Longmanns Green , London*
- DONGEN, W, J. van (1958) The function of polysaccharides in the spermiation of *Rana temporaria*. *Acta Physiol. Pharm. Neerl.* **7**, 535-536

DONGEN, W. J. van, KORT, E. J. M. DE (1959) Spermiation in the common frog (*Rana temporaria*). I. Experiments on the isolated testis. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Amsterdam* **62**, 320-326

DONGEN, W. J. van, DRAISMA, J. R., KORT, E. J. M. (1959) Spermiation in the common frog *Rana temporaria*. II. Experiments in vivo. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Amsterdam* **62**, 327-332

DUNBAR, B. S., DUDKIEWICZ, A., BUNDMANN, D. S. (1985) Proteolysis of specific porcine zona pellucida glycoproteins by boar acrosin. *Biol. Reprod.* **32**, 619-630

ELL, R. (1989) Keine Entwarnung für die Flüsse. *Süddeutsche Zeitung*, Nr. 110,14,5,1998

ERNST, B., JULIEN, G., DOE, K., PARKER, R. (1980) Environmental investigations of the 1980 Spruce Budworm Spray Program in Brunswick. EPS-5-AR-81-3, Surveillance Report, Canada. EPS

EUROPEAN COMMUNITY (1997) European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. *Workshop Publication EUR 17549, Paris, France*

EU-WASSERRAHMENRICHTLINIE (Richtlinie 2000/60/EG) Entscheidung Nr. 2455/2001/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20.11.01 zur Festlegung der Liste prioritärer Stoffe im Bereich der Wasserpolitik und zur Änderung der Richtlinie 2000/60/EG, Amtsblatt Nr. L331 vom 15/12/2001, S. 0001-0005

FILODA, H. (1983) Über Geschlechterverhältnis und Populationsdynamik der Erdkröte (*Bufo bufo*) und des Grasfrosches (*Rana temporaria*). *Abh. Naturwiss. Ver. Hamburg* **25**, 303-310

FOLLETT, B. K., REDSHAW, M. R. (1967) The effects of oestrogens and follicle stimulating hormone on the metabolism of lipids and proteins in *Xenopus laevis* Daudin *J. Endocrinol.* **38**, v-vi.

FOLLETT, B. K., REDSHAW, M. R. (1968) The effects of oestrogens and gonadotrophins on lipid and protein metabolism in *Xenopus laevis* Daudin. *J. Endocrinol.* **40**, 439-456

FOLLETT, B. K., REDSHAW, M. R. (1974) The physiology of vitellogenesis. Lofts, B. (Hrsg.), Physiology of the Amphibia. Vol. II, *Academic Press, New York, London*, 219-298

FLOURIOT, G., PAKDEL, F., DUCOURET, B., VALOTAIRE, Y. (1995) Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* **15**, 143-151

FOOTE, C. L., WITSCHI, E. (1939) Effect of sex hormones on the gonads of frog larvae (*Rana clamitans*): Sex inversions in females; stability in males. *Anat. Rec.* **75**, 75-83

FOOTE, C. L. (1964) Intersexuality in Amphibians. In "Intersexuality in Vertebrates Including Man" (C. N. Armstrong, Marshall ed.), Kap. 4, 233-272, *Academic Press, New York*

FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. (1992) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Bibliographisches Institut. B.I. Wissenschaftsverlag*

FRANCHI, L. L., MANDL, A. M., ZUCKERMAN, S. (1962) The development of the ovary and the process of oogenesis. In "The ovary" (S. Zuckerman, ed.) Vol. 1, 1-88, *Academic Press, New York*

GALLI MAININI, C. (1947) Reaccion diagnostica de emparazo en la que se usa el sapo macho como animal reactivo. *La Semana Medica* **54**, 337-340

Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) Physiology of the Amphibia. Vol. II, *Academic Press, New York, London*, 107-208

GALLIEN, L. (1937) Action masculinisant du propionate de testostérone dans la différenciation du sexe, chez *Rana temporaria*. *C. R. Acad. Sci.* **211**, 375-376 Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) Physiology of the Amphibia. Vol. II, *Academic Press, New York, London*, 107-208

GALLIEN, L. (1939) Hypophysectomie et cycle sexuel chez la grenouille rousse (*Rana temporaria*). *C. R. Acad. Sci. Paris* **208**, 766-767 Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) Physiology of the Amphibia. Vol. II, *Academic Press, New York, London*, 107-208

GALLIEN, L. (1940a) Recherches sur la physiologie hypophysaire dans ses relations avec les gonades et le cycle sexuel, chez la grenouille rousse, *Rana temporaria* L. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **74**, 1-42 Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208

GALLIEN, L. (1940b) Sur l'action amphisexuelle de la dihydrofolliculine dans la différenciation du sexe chez les batraciens. *C. R. Acad. Sci.* **211**, 665 Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208

GALLIEN, L. (1941) Recherches expérimentales sur l'actions amphisexuelle de l'hormone femelle (oestradiol), dans la différenciation du sexe chez *Rana temporaria* L. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **75**, 369-397 Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208

GALLIEN, L. (1943) Après la métamorphose, des gonades de *Rana temporaria* d'une race indifférenciée, après traitement par l'hormone femelle. *Soc. Biol.*, **137**, 9-10

GALLIEN, L. (1953) Inversion totale du sexe chez *Xenopus laevis* Daud. a la suite d'un traitement gynoene par le benzoate of oestradiol, administre pendant la vie larvaire. *C. R. Acad. Sci.* **237**, 1565-1566

GALLIEN, L. (1954) Inversion expérimentale du sexe sous l'action des hormones sexuelles chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. analyse des conséquences génétiques. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **88**, 1-51

GALLIEN, L. (1955) The action of sex hormones on the development of sex in Amphibia. *Mem. Soc. Endocrinol.* **4**, 188-204

GALLIEN, L. (1956) Inversion expérimentale du sexe chez un anoure inférieur *Xenopus laevis* Daudin. Analyse des conséquences génétiques. *Bull. Biol Fr. Belg.* **90**, 163-183

GALLIEN, L. (1957)

Inversion du phénotype sexuel, altérations da la gonadogenese et deternimisme de la différenciation des gonies chez les amphibiens. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI (Zool.)* **13**, 373-378

- GALLIEN, L. (1962) Inversion expérimentale du sexe chez un anouère inférieur *Xenopus laevis* Daudin. Analyse des conséquences génétiques. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **90**, 163-183
- GALLIEN, L. (1974) Intersexuality In "Physiology of the Amphibia.", *Academic Press, New York*, 523-549
- GALLIEN, L. Chalumeau-le FOULGOC, M. (1960) Mise en évidence de stéroïdes œstrogènes dans l'ovaire juvénile de *Xenopus laevis* Daudin, et cycles des œstrogènes au cours de la ponte. *C. R. Acad. Sci. Paris* **251**, 460-462 Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia. Vol. II*, Academic Press, New York, London, 107-208
- GATTI, J. L., DRUART, X., GUERIN, Y., DACHEUX, F., DACHEUX, J. L. (1999) A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Bio. Reprod.* **60** (4), 937-945
- GAUPP, E., ECKER, A., WIEDERSHEIM, R. (1904) Apparatus urogenitalis. In: Gaupp, E., Ecker, A. (Hrsg.) *Anatomie des Frosches. Vol. III*, Vieweg & Sohn, Braunschweig, 223-359
- GEISSELMANN, B., FLINDT, R., HEMMER, H. (1971) Studien zur Biologie, Ökologie und Merkmalsvariabilität der beiden Braunfroscharten *Rana temporaria* L. und *Rana dalmatina* Bonaparte. *Zool. Jahrb. Syst.* **98**, 521-568
- GIBBONS M. M., MCCARTHY, T. K. (1984) Age determination of frogs and toads (Amphibia, Anura) from north-western Europe. *Zool. Scr.* **12**, 145-151
- GIGER, W., BRUNNER, P. H., SCHAFFNER, CH. (1984) 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* **225**, 623-625
- GIMENO, S., GERRITSEN, A., BOWMER, T., KOMEN, H. (1996) Feminization of male carp. *Nature* **384**, 221-222
- GIMENO, S., BOWMER, C. T., KOMEN, J. (1997) Reproductive impairment in males of the common carp exposed to a model endocrine disruptor at various critical stages for reproduc-

tion. 7th Annual Meeting of SETAC-Europe, Amsterdam, The Netherlands, April 6-10, 1997
Abstract Books, T2-3.2

GLASS, F. M., RUGH, R. (1944) Seasonal study of the normal and pituitary-stimulated frog (*Rana pipiens*). I. Testis and Thumb-pad. *J. Morphol.* **74**, 409-428

GLAUNER, S. (1987) Abwasserbeseitigung am Starnberger See. Informationsbroschüre des „Abwasserverband Starnberger See – Zweckverband zur gemeinsamen Abwasserbeseitigung rund um den Starnberger See“ Seite 5-16

GOSNER, K.L. (1960) A simplified Table for staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on identification. *Herpetologica* **16**, 183-190

GRAY, L. E., METCALFE, C. D. (1997) Induction of testis. ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environm. Tox. Chem.* **16 (5)**, 1082-1086

GRAY, L. E. JR., KELCE, W. R., WIESE, T., TYL, R., GAIDO, K., COOK, J., KLINEFELTER, G., DESAULINIERS, D., WILSON, E., ZACHAREWSKI, T., WALLER, C., FOSTER, P., LASKEY, J., REEL, J., GIESY, J., LAWS, S., MC LACHLAN, J., BRESLIN, W., COOPER, R., GIULIO, R. DI, JOHNSON, R., PURBY, R., MIHAICH, E., SAFE, S., SONNENSCHNEIN, C., WELSHONS, W., MILLER, R., MC MASTER, S., COLBORN, T. (1997) Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity of chemicals that act via receptor of steroidogenic enzyme mechanisms. *Reproductive Toxicology II (5)*, 719-750

GRINSHTEIN, S. V., BINEVSKI, P. V., GOMAZKOV, O.A., PROZDNEF, V. F., NIKOLSKAYA II, KOST, O. A. (1999) Inhibitor analysis of angiotensinogen I-converting and kinin-degrading activities of bovine lung and testicular angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry (Mosc)* **64 (8)**, 938-944

GROSSENBACHER, K. (1980) Beitrag zur Populationsdynamik des Grasfrosches *Rana temporaria*, nebst Bemerkungen zur Erdkröte *Bufo bufo* (Amphibia, Anura). *Jahrb. nat. hist. Museum Bern* **7**, 177-193

- GÜLDEN, M. (1995) In vivo und in vitro Verfahren zur Bestimmung östrogenener Potenz von Umweltchemikalien. In: *Umweltbundesamt (Hrsg.), „Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung.“ Texte 65/95*, Fachgespräch Berlin 9./10. März 1995, 86-95
- GÜLDEN, M., TURAN, A., SEIBERT, H. (1997) Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. *Hrsg.: Umweltbundesamt, Bericht Nr. UBA-FB 97-068*
- GUILLETTE JR., L.J., GROSS, T. S., MASSON, G. R., MATTER, J. M., PERCIVAL, H. F., WOODWARD, A. R. (1994) Developmental abnormalities of the gonads and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Persp.* **102**, 680-688
- GUILLETTE JR., L. J., CRAIN, D. A., ROONEY, A. A., PICKFORD, D. B. (1995) Organisation in versus activation. The role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryogenesis development in wildlife. *Environ. Health Persp.* **103** (Suppl. 7), 157-164
- HAGAMAN, J. R., MOYER, J. S., BACHMAN, E.S. SIBONY, M., MAGYAR, P. L., WELCH, J. E., SMITHIES, O., KREGGE, J. H., O'BRIEN, D. A. (1998) Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (5), 2552-2557
- HANSEN, P. D., DIZER, H., HOCK, B., MARX, A., SHERRY, J., MCMASTER, M., BLAISE, C. (1998) Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal. Chem.* **17**, 448-451
- HARRIES, J. E., SHEAHAN, S., JOBLING, S., MATTHIESSEN, P. , NEALL, P., SUMPTER, J. P., TYLOR, T., ZAMAN, N. (1997) Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 534-542
- HAYES, T. B. (1989) Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. *J. Exp. Zool.* **281**, 373-399
- HEES, H (1992) Kreislaufsystem In: „Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie“, Hees, H. und Sinowatz, F., *Deutscher Ärzte-Verlag, Köln*, 1992
- HELBERND, L. (1985) Vergleichende Untersuchungen zur Bionomie sympatrischer Populationen zweier Braunfroscharten. Diplomarbeit Univ. Bremen

- HERMANN, L. H., KINCAID, H. L. (1988) Pathological effects of orally administrated estradiol to rainbow trout. *Aquaculture*, **72**, 165-172
- HERTWIG, I. SCHNEIDER, H. (1989) A revised staging table for better identification of embryos and larvae of the Grass frog, *Rana temporaria* L. (Amphibia, Anura) *Zool. Jb. Anat.* **118**, 309-324
- HEUSSER, H. (1970) Ansiedlung , Ortstreue und Populationsdynamik des Grasfrosches (*Rana temporaria*) an einem Gartenweiher. *Salamandra* **6**, 80-87
- HEYDE, F. VAN DER (2000) Untersuchungen zur neuroendokrinen Wirkung von Nonylphenol bei juvenilen Regenbogenforellen. *Inaugural-Dissertation der Tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der LMU München*
- HIBIYA, T. (1992) An atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. *G. Fischer Verlag Stuttgart-New York*, 1. Auflage
- HILEMANN, B. (1998) The puzzle of frog deformities
- HILLIS, D. M., GREEN, D. M. (1990) Evolutionary changes of heterogametic sex in phylogenetic history of amphibians. *J Evol. Biol.*, **3**, 49-64
- HINTERMANN, URS (1984) Populationsdynamische Untersuchungen am Grasfrosch *Rana temporaria* Linnaeus, 1748. *Salamandra* **20**, 2/3, 143-166
- HOLCOBE, G. W., PHIPPS, G. L., KNUTH, M.L., FELHABER, T. (1984) The acute toxicity of selected substituted phenols, benzenes and benzoic acid ester to fathead minnows *Pimephales promelas*. *Environ. Poll.* **35**, 367-381
- HOLT, M. S. ET AL. (1991) In: Hutzinger O. (Hrsg.) "The Handbook of Environmental Chemistry 3", Part F, 128-144
- HOPE, J., HUMPHRIES, A. A., BOURNE, S. H. (1963) Ultrastructural studies in developing oocytes of the salamander *Triturus viridescens*. I. The relationship between follicle cells and developing oocytes. *J. Ultrastruct. Res.* **9**, 302-324

- HOUSSAY, B. A., LASCANO-GONZALES, J. M. (1929) Relaciones entre la hipofisis y el testiculo en el sapo. *Rev. soc. Argent. Biol.* **5**, 77-88
Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208
- HSU, M., RAINE, L., FANGS, H. (1981) Use of Avidin-biotin- Peroxidase-complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 577-580
- HSÜ. C.-Y., YÜ, N.-W., LIANG, H.-M. (1971) Induction of sex reversal in female tadpoles of *Rana catesbeiana* by temperature treatment. *Endocrinol. Jpn.* **18**, 243-251
- HÜLS (1996) EG-Sicherheitsdatenblatt: Nonylphenol. *Hüls, Aktiengesellschaft, Marl*
- IDLER, D. R., CAMPBELL, C. M. (1980) Gonadotropin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **41**, 384-391
- IJIRI, K.-I., EGAMI, N. (1975) Mitotic activity of germ cells during normal development. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **34** (3), 687-694
- IWASAWA, H., ASAI, O. (1959) Histological observations on the seasonal changes of the testis and thumb-pad in the frog *Rana nigromaculata*. *J. Fac. Sci. Niigata Univ.* **2**, 213-219
- JOBLING, S., SUMPTER, J. P. (1993) Detergents components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* **27**, 361-372
- JOBLING, S., REYNOLDS, T., WHITE, R., PARKER, M. G., SUMPTER, J. P. (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Persp.* **103**, 581-587
- JOBLING, S., SHEAHAN, D., OSBORNE, J. A., MATTHIESSEN, P., SUMPTER, J. P. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Tox. Chem.* **15** (2), 194-202

JOBLING, S., NOLAN, M., BRIGHTY, G., TYLER, C. R., SUMPTER, J. P. (1997) British rivers contain a high proportion of intersex roach (Cyprinidae, Pisces). 7th Annual Meeting of SETAC-Europe, Amsterdam, The Netherlands, April 6-10, 1997. *Abstract Book*, T2-1.3

JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C. R., BRIGHTY, G., SUMPTER, J.P: (1998) Wide-spread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2498-2506

JOLY, J., PICHERAL, B. (1972) Ultrastructure, histochemie et physiology du follicle pre-ovulatoire et du corps jaune de l'urodele ovo-vivipare, *Salamandra salamandra* (L.) *Gen. Comp. Endocrinol.* **18**, 235-259

Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208

JÜRGENS, M., JOHNSON, A. C., JEKEL, M. (1998) Das Verhalten von Steroidöstrogenen in Flüssen. 3. deutschsprachige SETAC-Europe-Tagung: Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie. Zittau 18./19.3.1998. Tagungsprogramm und Abstracts, S. 103

JURAND, A. (1957) Rozwoj i roznicowanie gonad u *Xenopus laevis* Daud. *Folia Biol.* **5**, 123-149 Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208

KALBFUS, W. (1997) Belastung bayerischer Gewässer durch synthetische östrogene. In: *Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser*. Bayer. Landesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Wasserforschung, München. Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie, Bd. **50**, 31-38 *Oldenbourg-Verlag*

KARLSON, P.; DOENECKE, D.; KOOLMANN, J. (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler; 14. Auflage, *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York*

KARNOVSKY, A (1965) A formaldehyde-glutaraldehyd fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **27**, 137

KAWAMURA, T., YOKOTA, R. (1958) The offspring of sexreversed females of *Rana japonica* Guenther. *J. Fac. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B Div 1*, **18**, 31-38

- KEMP, N. E. (1956) Electron microscopy of growing oocytes of *Rana pipiens*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 281-292
- KESSEL, R. G., PANJE, W. R. (1968) Organization and activity in the pre- and postovulatory follicle of *Necturus maculosus*. *J. Cell Biol.* **39**, 1-34
- KIM, H. S., KREGE, J. H., KLUCKMANN K. D., HAGAMAN J.R., HODGIN, J.B., BEST C. F., JENNETTE, J. C., COFFMAN, T. M., MAEDA, M., SMITHIES, O. (1995) Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2735-2739
- KLOAS, W. UND LUTZ I. (1997) Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung: Amphibien als Studienmodell. *Veröff. PAÖ* **22**, 231-240
- KLOAS, W., LUTZ, I., EINSPANIER, R. (1999) Amphibians as model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *The Science of the Total Environment* **225**, 59-68
- KÖRNER, W.; BOLZ, U.; SÜSSMUTH, W; HILLER, G.; HANF, V.; HAGENMAIER, H. (1998) Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Endocrine disruption II; Organohalogen compounds* **37**, 269-273
- KOPSCH, F. (1952) Die Entwicklung des braunen Grasfrosches *Rana fusca* (Roesel) dargestellt in der Art der Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere. *Thieme Verlag, Stuttgart*
- KREUTZIG, T. (1990) Biochemie. 6. Auflg. *Jungjohann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm, Stuttgart*, 366-369
- KRISHNAN, A. V., STATHIS, P., PERMUTH, S. F., TOKES, L., FELDMAN, D. (1993) Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**, 2279-2286
- KUMAKURA, M., IWASAWA, H. (1992) Ultrastructural observations on the development of the gonad in two species of urodelan amphibians, *Hynobius migrescens* and *Cynops pyrrhogaster*. *Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. D (Biology)* **29**, 13-26

- LASKOWSKI, M. (1935) Über die Phosphorverbindung des Blutplasmas der Legehennen
Biochem. Z. **279**, 293-300
- LASKOWSKI, M. (1936) Vorkommen des Serumvitellins im Blut der Wirbeltiere. *Biochem. Z.*
284, 318-325
- LAZIER, C. B., LONERGAN, K., MOMMSEN, T. P. (1985) Hepatic estrogen receptors and
plasma estrogen binding activity in the Atlantic salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57**, 234-245
- LEISEWITZ, A. (1996) Reproduktionsschäden und Umwelthormone – ein neues Umweltpro-
blem? Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung und Reproduktionsschäden bei sieben
europäischen Tierarten. *Greenpeace (Hrsg.)*
- LIEBICH, H.-G. (1993) Funktionelle Histologie. 2. Aufl., *Schattauer Verlag, Stuttgart, New
York*
- LOFTS, B. (1964) Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and sper-
matogenetic tissues of the green frog, *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **4**, 550-562
- LOFTS, B. (1961) The effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on the
testis of hypophysectomized frogs (*Rana temporaria*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **1**, 179-189
- LOFTS, B. (1968) Patterns of testicular activity. In: Barrington, E: J. W.; Barker, C. Jorgen-
sen: "Perspectives in Endocrinology : Hormones in the Lives of Lower Vertebrates", 239-
304, *Academic Press, New York*
- LOFTS, B. (1972) The Sertoli Cell. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* **3**, 636-648
- LOFTS, B. (1974) Reproduction. In: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia. Vol. II*,
Academic Press, New York, London, 107-208
- LOPEZ, K. (1989) Sex differentiation and early gonadal development in *Bombina orientalis*,
Anura, Discoglossidae. *J. Morphol.* **199**, 299-312

LUTZ, I., KLOAS, W. (1999) Amphibians as model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *The Science of the Total Environment* **225**, 49-57

MANCINI, R. E., BURGOS, M. H. (1948) Mucopolysacardios en la espermatogenesis del sapo. *Rev. Soc. Argent. Biol.* **24**, 318-327

Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208

MARCH, F. (1937) Some hormone effects in Amphibia. *Proc. Zool. Soc. London* **107**, 603-665

MARTIN, G. R. TIMPL, R. (1987) Laminin and other basement membrane components. *Ann. Rev. Cell Biol.* **3**, 57-85

McLEESE, D.W., SERGEANT, D. B., METCALFE, C, D., ZITKO, V., BURRIDGE, L. E. (1980a) Uptake and excretion of aminocarp, nonylphenol, and pesticide diluent 585 by mussels (*Mytilus edulis*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **24**, 575-581

McLEESE, D. W., ZITKO, V., METCALFE, C, D., SERGEANT, D. B (1980b) Lethality of aminocarp and the components of the aminocarp formulation to juvenile Atlantic Salmon, marine invertebrates, and a freshwater clam. *Chemosphere* **9**, 79-82

McLEESE, D. W., ZITKO, V., SERGEANT, D. B., BURRIDGE, L. E., METCALFE, C, D. (1981) Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere* **10**(7), 723-730

MIALHE-VOLOSS, C. (1956) Variations saisonnières de la sensibilité aux hormones gonadotropes hypophysaires de la grenouille male *Rana esculenta*. *J. Physiol. Paris* **48**, 649-654
Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208

MIKAMO, K, WITSCHI, E. (1964) Masculinization and breezing of the WW Xenopus. *Experientia* **20**, 622-623

MOMMSEN, T. P., WALSH, P. J. (1988) Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. (eds.): "Fish Physiology" Vol. XI A, *Academic Press, New York*, 347-406

MÜLLER, G. C., KIM, U. (1978) Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols. *Endocrinology* **102** (3), 1429-1435

MUNDAY, K. A., ANSARI, A. Q., OLDROYD, K., AKHTAR, M. (1968) Oestrogen-induced calcium-binding protein in *Xenopus laevis*. *Biochim. Biophys. Acta* **166**, 748-751

NAGEL, S. C., SAAL, F. S. VOM, THAYER, K. A., DHAR, M. G., BOECHLER, M., WADE, V. (1997) Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ. Health Persp.* **105** (1), 170-176

NICHOLLS, T. J., FOLLETT, B. K., EVENNETT, P. J. (1968) The effect of estrogens and other steroid hormones on the ultrastructure of the liver of *Xenopus laevis* Daudin. *Z. Zellforsch.* **90**, 19-27

NICHOLLS, T. J. (1969) The cytological effect of hormones during vitellogenesis in *Xenopus laevis* Daudin. *Thesis, Univ. of Leeds.*

NIEUWKOOP, P. D., FABER, J. (1956) Normal table of *Xenopus laevis* Daudin. *North-Holland Publishing Company, Amsterdam*, 130-139

NIEUWKOOP, P. D., FABER, J. (1975) Normal table of *Xenopus laevis* Daudin. *North-Holland, Amsterdam*

NIMROD, A. C., BENSON, W. H. (1996) Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **26**, 335-354

OBERT, H.-J. (1977) Ökologische Untersuchungen zum Rückgang von Froschlurchen in zwei Biotopen des Rhein-Sieg-Gebietes zwischen 1971 und 1976. *Salamandra* **13**, 121-140

OECD (1984) OECD-Guideline for testing of chemicals; 204, fish, "Prolonged toxicity study of at least 14 days". *OECD, Paris*, S.9

OLDHAM, R. S. (1963) Homing behaviour in *Rana temporaria*. *Linn. Brit. J. Herpet.* **3**, 116-127

OORDT, G. J. VAN, SLUITER, J. W., OORDT, P. G. W. J. (1951) Spermatogenesis in normal and hypophysectomized frogs (*Rana temporaria*), following gonadotrophin administration. *Acta Endocrinol.* **7**, 257-269

OORDT, G. J. VAN, BEENAKKERS, A. M. T., OORDT, P. G. W. J. VAN, STADHOUDERS, A. M. (1954) On the mechanism of the initial stages of spermiation in the Grass Frog, *Rana temporaria*. *Acta Endocrinol.* **17**, 294-301

OORDT, G. J. VAN, OORDT, P. G. W. J. VAN (1955) The regulation of the spermatogenesis in frog. *Mem. Soc. Endocrinol.* **4**, 25-38

OORDT, P. G. W. J. VAN (1956) "Regulation of the Spermatogenetic Cycle in the Common frog (*Rana temporaria*)."
van der Wiel, Arnhem.

OORDT, P. G. W. J. VAN (1960) The influence of internal and external factors in the regulation of the spermatogenetic cycle in amphibian. *Symp. Zool. Soc. London* **2**, 29-52

OORDT, P. G. W. J. (1961) The gonadotropin producing and other cell types in the distal lobe of the pituitary of the common frog, *Rana temporaria*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1**, 364-374

OORDT, P. G. W. J. VAN, KONGEN, W. J. VAN, LOFTS, B. (1968) Seasonal changes in endocrine organs of the male common frog, *Rana temporaria*. I. The pars distalis of the adenohypophysis. *Z. Zellforsch.* **88**, 549-559

OORDT, P. G. W. J. VAN; KORT, E. J. M. DE (1969) Functions of gonadotropins in adult amphibian. In "La Spécificité zoologique des hormones hypophysaires et des leurs activités. (M. Fontaine, ed.) *Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci.* **177**, 345-350

OORDT, P. G. W. J. VAN; BRANDS, F (1970) The sertoli cells in the testis of the common frog *Rana temporaria*. *J. Endocrinol.* **48**,1

OSPAR (1994) Nonylphenol ethoxylates. Background document to PARCOM recommendation 92/8. Oslo and Paris conventions for the prevention of marine pollution working group on diffuse sources (DIFF). London, 25.-28. Okt. 1994. *Agenda Item* **10**

- OTSUKA, S. (1957) Comparative studies on the pituitary hormones of vertebrates. IV. Extraction of the follicle stimulating and luteinizing substances in domestic fowls and frogs. *Endocrinol. Japan* **4**, 214-226
- OZON, R. (1967) Synthèse in vitro des hormones stéroïdes dans le testicule et l'ovaire de l'Amphibiens Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. *Gen. Comp. Endocrinol.* **8**, 214-227
Zitiert nach Lofts, B. (1974): "Reproduction", in: Lofts, B. (Hrsg.) *Physiology of the Amphibia*. Vol. II, Academic Press, New York, London, 107-208
- OZON, R., BREUER, H. (1964) Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten, IV Aromatisierung von Testosteron zu Östrogenen im Ovar des Frosches (*Rana temporaria*). *H-S. Z. Physiol. Chem.* **337**, 61-65
- OZON, R., MARTIN, B., BOFFA, G. A. (1971) Protein binding of estradiol and testosterone in newt serum (*Pleurodeles waltlii* Michah.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **17**, 566-570
- PALMER, B. D., HUTH, L.K., PIETRO, D. L., SELCER, K. W. (1998) Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system. *Environ. Toxicol. Endocrinol.* **17**, 30-36
- PAN, M. L., BELL, W. J., TELFER, W. H. (1969) Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body *Science* **165**, 393-394
- PASCUAL, X., MONTORI, A. (1981) Contribution al studio de *Rana temporaria* L. (Amphibia, Ranidae) en Sta. Fe de Montseny (Barcelona) . I. Descripción de la zona y estimación de la población. *Misc. Zool.* **7**, 109-115 Zitiert nach RYSER, J. (1986) Altersstruktur, Geschlechterverhältnis und Dynamik einer Grasfrosch-Population (*Rana temporaria* L.) aus der Schweiz. *Zool. Anz.* **217** ^{3/4}, 234- 251
- PEARLMAN, W. H., CERECERO, E., THOMAS, M. (1954) The conversion of \cdot^5 -pregnen-3 \cdot -ol-20-one to progesterone by homogenates of human placental tissue. *J. Biol. Chem.* **208**, 231-239
- PELLEY, J. (1998) No simple answer to recent amphibian declines. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 352A-353A

PIEAU, C. (1975) Effets des variations thermiques sur la différenciation du sexe chez la vertèbres . *Bull. Soc. Zool. Fr.* **100**, 67-76 Zitiert nach RYSER, J. (1986) Altersstruktur, Geschlechterverhältnis und Dynamik einer Grasfrosch-Population (*Rana temporaria* L.) aus der Schweiz. *Zool. Anz.* **217** ³/₄, 234- 251

PIQUET, J. (1930) Détermination du sexe chez les batraciens en fonction de la température. *Rev. Suisse Zool.* **37**, 173-281

POLZONETTI-MAGNI, A., LUPO di PRISCO, C., RASTOGI, R. K., BELLINI-CARDELLINI, L., CHIEFFI, G. (1970) Estrogens in the plasma of females of *Rana esculenta* during the annual cycle and following ovariectomy. *Gen. Comp. Endocrinol.* **14**, 212-213

PONSE, K. (1949) La différenciation du sexe et l'intersexualité les Vertèbres. *F. Rouge. Lausanne*

PURDOM, C. E., HARDIMAN, P. A., BYE, V. J., ENO, N. C., TYLER, C. R., SUMPTER, J. P. (1994) Estrogenic effects of effluents form sewage treatment works. *Chem. Ecol.* **8**, 275-285

RAMCHANDRAN, R., SEN, I., (1995) Cleavage processing of angiotensin-converting-enzyme by a membrane associated metalloprotease. *Biochemistry* **34**, 12645-12652

RASTOGI, R. K. , CHIEFFI, G. (1970) A cytological study of the pars distalis of pituitary gland of normal, gonadectomized and gonadectomized steroid hormone-treated green frog, *Rana esculenta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **15**, 247-263

RAVEN, C. P. (1961) "Oogenesis: The Storage of Developmental Information" *Pergamon, Oxford*

REDSHAW, M. R., FOLLETT, B. K. (1971) The crystalline yolk platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian (*Xenopus laevis*). *Biochem. J.* **124**, 759-766

REDSHAW, M. R., NICHOLLS, T. J. (1971) Oestrogen biosynthesis by ovarian tissue of the South African clawed toad *Xenopus laevis* Daudin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **16**, 85-96

REDSHAW, M. R., FOLLETT, B. K., NICHOLLS, T. J. (1969) Comparative effects of the estrogens and other steroid hormones on serum lipids and proteins in *Xenopus laevis* Daudin. *J. Endocrinol.* **43**, 47-53

REN, L., MARQUARDT, M. A., LECH, J.J. (1997) Estrogenic effects on nonylphenol on pS 2, ER and MUC1 gene expression in human breast cancer cells-MCF-7. *Chemico-Biological Interactions* **100**, 67-76

REYNOLDS, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17** 208-211

RICHARDS, C. M., NACE, G. W. (1978) Gynogenetic and hormonal sex reversal used in tests of the XX-XY hypothesis of sex determination in *Rana pipiens*. *Growth* **12**, 319-331

RICHARDSON, K. C., JARETT, L., FINKE, E. M. (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* **35**, 313-323

ROEPKE, R. R., HUGHES, J. S. (1935) Phosphorus partition in the blood serum of laying hens. *J. Biol. Chem.* **108**, 79-88

ROTH, L. (1996) Wassergefährdende Stoffe. 29. Erg. Lfg. 11/96, 37 *Ecomed Verlag, Landsberg/Lech*

RÜSSE, I. (1991) Furchung und Teilung. Rüsse, I., Sinowatz, F., Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, *Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg*, 131-137

RUDACK, D., WALLACE, R. A. (1968) On the site of phosphovitin synthesis in *Xenopus laevis* *Biochem. Biophys. Acta* **155**, 299-301

RYSER, J. (1986) Altersstruktur, Geschlechterverhältnis und Dynamik einer Grasfrosch-Population (*Rana temporaria* L.) aus der Schweiz. *Zool. Anz.* **217** ³/₄, 234- 251

SACCO, A. G.; YUREWICZ, E. C.; SUBRAMANIAN, M. G. ; DE MAYO, F. J. (1981) Zona pellucida composition: species cross reactivity and contraceptive target antigen. *Biol. Reprod.* **25**, 997-1008

SAMUELS, L. T., HELMREICH, M. L., LASATER, M. B., REICH, H. (1951) An enzyme in endocrine tissues which oxidizes, \bullet^5 - $3\bullet$ -hydroxysteroids to \bullet , \bullet unsaturated ketones. *Science* **113**, 490-491

SHARPE, T., FISCHER, J.S., MILLAR, M.M., JOBLING, S., SUMPTER, J.P. (1995) Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Perspect.* **103**, 1136-1143

SCHJEIDE, O.A., URIST, M. R. (1959) Proteins and Calcium in egg yolk. *Exp. Cell Res.***17**, 84-94

SCHLÜPMANN, M., GÜNTHER, R. (1996) Grasfrosch – *Rana temporaria Linnaeus*, 1758 in "Die Amphibien und Reptilien Deutschlands", Günther, R. (Hrsg.) *Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm*

SCHWAIGER, J., WANKE, R., ADAM, S., PAWERT, P., HONNEN, W. TRIEBSKORN, R. (1997) The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquatic Stress Recov.* **6**, 75-86

Vgl. Diskussion „Histopatholog. Befunde“

SCHWAIGER, J. (1998) Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, 1998: Bericht des Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft an den Bayerischen Landtag vom 15.12.1998 über Untersuchungen, Gefährdungspotenzial und Vorsorgemaßnahmen zu endokrinen Substanzen mit besonderem Augenmerk auf bayerische Gewässer. S. 5

SCHWAIGER, J. (1999) Nonylphenol-Konzentrationen der Würm im Herbst 1999. Negele, R. 1999: persönliche Mitteilung

SCHWAIGER, J., SPIESER, O. H., BAUER, C., FERLING, H., MALLOW, U., KALBFUS, W., NEGELE, R. D. (2000) Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicol.* **51**, 69-78

SCHWAIGER, J. (2001) Histopathological alterations and parasite infections in fish: indicators of multiple stress factors. *J. Aquatic Stress Recov.* **8**, 231-240

SCHWAIGER, J.; MALLOW, V.; FERLING, H.; KNOERR, S.; BRAUNBECK, KALBFUS, W.; NEGELE, R. D. (2002) How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout as a test organism. *Aquatic Toxicology*, **59**, 177-189

SCHWEINFURTH, H., LÄNGE, R., MIKLAUTZ, A., SCHAUER, G. (1997) Umweltverhalten und aquatische Toxizität von Ethinylestradiol. In: Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser. Bayer. Landesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Wasserforschung, München. *Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie*, Bd. **50**, 39-54

SELF, D. A.; SCHRÖDER, P. C.; GOWN, A. M. (1988) Hamster thecal cells express muscle characteristics. *Biol. Reprod.* **39** (1), 119-130

SINOWATZ, F. (1992) Die Zelle In: „Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie“, Hees, H. und Sinowatz, F., *Deutscher Ärzte-Verlag, Köln*, 1992

SKLOWER, A. (1925) Das inkretorische System in Lebenszyklus der Frösche (*Rana temporaria* L.). I. Schilddrüse, Hypophyse, Thymus und Keimdrüsen. *Z. Vergl. Physiol.* **2**, 474-524

SMITH, L. D., ECKER, R. E., SUBTELNY, S. (1968) In vitro induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from ovarian follicles. *Develop. Biol.* **17**, 627-643

SOTO, A. M., JUSTICIA, H., WRAY, J. W., SONNENSCHNEIN, C. (1991) p-Nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from „modified“ polystyrene. *Environ. Health Persp.* **92**, 167-173

SOTO, A. M., SONNENSCHNEIN, C., CHUNG, K. L., FERNANDEZ, M. F., OLEA, N., OLEA SERRANO, F. (1995) The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Persp.* **103** (7), 113-122

SPETH, R. T., DAUBERT, D. L., GROVE, K. L. (1999) Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regul. Pept.* **79** (1), 25-40

SPENGLER, P.; KÖRNER, W.; METZGER, J. W. (1999) Schwer abbaubare Substanzen mit östrogenartiger Wirkung im Abwasser von kommunalen und industriellen Kläranlagenabläufen. *Sonderdruck aus „Vom Wasser“* **93**. Band

SPIESER, O.H., SCHWAIGER, J., FERLING, H., NEGELE, R.D. (2000) An introduction to behavioural monitoring effects on nonylphenol and ethinylestradiol on swimming behaviour of juvenile carp. In: BUTTERWORTH, F. M., GUANATILAKA, G., GONSEBATT, M. E. (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Vol. II. *Plenum Press*, New York, pp. 93-112

STUMPF, M., TERNES, T. A., HABERER, K., BAUMANN, W. (1996) Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* **87**, 251-261

SUMPTER, J. P., JOBLING, S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Persp.* **103** (Suppl. 7), 173-178

SWEDEN (1994) Nonylphenol Ethoxylates. Background document to PARCOM Recommendation 92/8. Oslo and Paris conventions for the prevention of marine pollution working group on diffuse Sources (DIFF). London, 25.-28. Okt. 1994. *Agenda item* **10**

SWINGLE, W. W. (1926) The germ cells of anurans. II. An embryological study of sex differentiation in *Rana catesbeiana*. *Z. Morphol.* **41**, 441-546

TAJIMA, H., ARAI, R., TAMAOKI, B. I., HANAOKA, K. I. (1969) In vitro steroidogenesis in testicular homogenates of the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster* (Boie). *Gen. Comp. Endocrinol.* **12**, 549-555

TAM, P. P. L., BUN, T., WOO, N. Y. S. (1983) Effects of estradiol-17 β and testosterone on the histology of pituitary, liver, ovary and skin of previtellogenic *Epinephelus akaara* (Teleostei, Serranidae). *Cell Tissue Res.* **231**, 579-592

TANIMURA, A., IWASAWA, H. (1989) Origin of somatic cells and histogenesis in the primordial gonad of Japanese tree frog *Rhacophorus arboreus*. *Anat. Embryol.* **180**, 165-173

TANIMURA, A., IWASAWA, H. (1991) Proliferate activities of somatic cells during gonadal development in the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. *J. Exp. Zool.* **259**, 365-370

- TANIMURA, A., IWASAWA, H. (1992a) Ultrastructural observations of the ovary and bidder's organ in young toad, *Bufo japonicus formosus*. *Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. D (Biology)* **29**, 27-33
- TANIMURA, A., IWASAWA, H. (1992b) Origin of somatic cells in bidder's organ and the gonad in the toad, *Bufo japonicus formosus*. *Zool. Sci.* **9** (2), 439-444
- TANIMURA, A., IWASAWA, H. (1993) Ultrastructural studies on the development of amphibians gonad: Disproof of Witschi's cortico-medullary antagonistic theory. *Sci. Ser. D (Biology)* **30**, 1-23
- TANIMURA, A., IWASAWA, H. (1988) Ultrastructural observations on the origin and differentiation of somatic cells during gonadal development in the frog *Rana nigromaculata*. *Devel. Growth Differ.* **30**, 681-691
- TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MÜLLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.-D.; SERVOS, M. (1999) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment* **225**, 81-90
- TSCHUI, M., BRUNNER, P.H. (1985) Die Bildung von 4-Nonylphenol aus 4-Nonylphenolmono- und -diethoxylat bei der Schlammfäulung. *Vom Wasser* **64**, 9-19
- TYLER, C. R., ROUTLEDGE, E. J. (1998) Natural and anthropogenic environmental estrogens: the scientific basis for risk assessment. Estrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl. Chem.* **70** (9), 1795-1804
- UBA (1997a) Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Texte 46/97
Gülden, M. von, Turan, A., Seibert, H. *Umweltbundesamt, Forschungsbericht* 102 04 279,
UBA-FB 97-068
- UNSICKER, K. (1975) Fine structure of the male genital tract and kidney in the anura *Xenopus laevis* Daudin, *Rana temporaria* L and *Bufo bufo* L. under normal and experimental conditions. I. Testicular interstitial tissue and seminal efferent ducts. *Cell Tiss. Res.* **158**, 215-240

UNSICKER, K.; BURNSTOCK, G. (1975) Myoid cells in the peritubular tissue (Lamina propria) of the reptilian testis. *Cell Tiss. Res.* **160**, 545-560

URIST, M. R., SCHJEIDE, O.A., MC LEANS, F. C. (1958) The partition and binding of calcium in the serum of the saying gen and oestrogenised rooster. *Endocrinology* **63**, 570-585

WAKE, D. B. (1991) Declining amphibian populations. *Science* **253**, 860

WALLACE, R. A. (1964) Studies on amphibian yolk. VI. A protein kinase from the ovary of *Rana pipiens*. *Biochem. Biophys. Acta* **86**, 286-294

WALLACE, R. A. (1967) A serum lipophosphoprotein produced by vitellogenic females and estrogenized males of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* **35**, 137A

WALLACE, R. A., HO, T. (1972) Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. II. A survey of inhibitors. *J. Exp. Zool.* **181**, 303-318

WASSARMANN, P. M. (1983) Oogenesis: synthetic events in the developing mammalian egg. In: HARTMANN, J. F. (ed.): Mechanism and control of animal fertilization. *Academic press, New York*, 1-55

WASSARMANN, P. M. (1988) Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 415-442

WALLACE, R. A., JARED, D. W. (1968a) Serum lipophosphoprotein induced by estrogen in males of *Xenopus laevis*. *Science* **160**, 91-92

WALLACE, W. A., JARED, D. W. (1969) Studies on amphibian yolk. VIII. The estrogen-induced hepatic synthesis of a serum lipophosphoprotein and it's selective uptake by the ovary and transformation into yolk platelet proteins in *Xenopus laevis*. *Develop. Biol.* **19**, 498-526

WALLACE, R. A., JARED, D., NELSON, B. L. (1970) Protein incorporation by isolated amphibians oocytes. 1. Preliminary studies. *J. Exp. Zool.* **175**, 259-270

WALLES, B.; GRÖSCHEL-STEWART, U.; OWMANN, C. H.; SJOBERG, N. O.; UNSICKER, K. (1990) Immunocytochemical demonstration of contractile cells in the human ovarian follicle. *Experientia* **46** (7), 682-683

WARTENBERG, H. (1962) Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen über die Oogenese der Amphibien Eizelle. *Z. Zellforsch.* **58**, 427-477

WEIRICH, D., HERTWIG, I., SCHNEIDER, H. (1993) Die Entwicklung des Urogenitalsystems beim Grasfrosch *Rana temporaria* (L.), Anura, Amphibia. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **86** (1); 182

WEIRICH, DAGMAR (1994) Die Entwicklung des Urogenitalsystems des Grasfrosches, *Rana temporaria* L., Anura, Amphibia. *Inaugural-Dissertation der Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität zu Bonn*

Weiss, E.; Käufer-Weiss, I. (1999) Geschlechtsorgane, In: Dahme, E.: Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 5. Auflage, *Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart*

WHITE, R., JOBLING, S., HOARE, S. A., SUMPTER, J. P., PARKER, M.G. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* **135** (1), 175-182

WIEBE, J. P. (1970) The mechanism of action of gonadotrophic hormones in amphibians: the stimulation of ^{3}H - $^{17}\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testes of *Xenopus laevis* Daudin. *J. Endocrinol.* **12**, 256-266

WISCHNITZER, S. (1964) Electron microscopy of the formation of the zona pellucida in oocytes from *Triturus viridescens*. *Z. Zellforsch.* **64**, 196-209

WITSCHI, E. (1914) Studien über die Geschlechtsbestimmung bei Fröschen. *Archiv. Mikros. Anat.* **86**, 1-51

WITSCHI, E. (1921) Development of gonads and transformation of sex in the Frog. *Amer. Natur.* **55**, 529-538

WITSCHI, E. (1924) Die Entwicklung der Keimzellen der *Rana temporaria*, Erster Teil: Urkeimzellen und Spermatogenese. *Z. Zellforsch. Mikr. Anat.* **12**, 134-178

WITSCHI, E. (1925) Studien über die Geschlechtsumkehr und sekundäre Geschlechtsmerkmale der Amphibien. *Archiv der Julius-Klaus-Stiftung für Vererbungsforschung, Sozialanthropologie und Rassenhygiene* **1** (2), 9-127

WITSCHI, E. (1929) Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians: II. Sex reversal in female tadpoles of *Rana sylvatica* following the application of high temperature. *J. Exp. Zool.* **52**, 267-289

WITSCHI, E. (1930) The geographical distribution of the sex races of the European Grass Frog (*Rana temporaria*). A. contribution to the problem of the evolution of sex. *J. Exp. Zool.* **56**, 149-165

WITSCHI, E. (1934) Sex deviations, Inversions and Parabiosis. In "Sex and Internal Secretions" (E. Allen, ed.), Kap. V. 160-245. *Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland*

WITSCHI, E. (1948) Vorträge an der Hauptversammlung der S.S.G.. Geschlechtsbestimmung durch Chemikalien. *Julius Klaus-Stiftung*, **23**, 525-538

WITSCHI, E. (1956) Development of vertebrates. *Saunders, London, Philadelphia*

WITSCHI, E., ALLISON, J. (1950) Responses of *Xenopus* and *Alytes* to the administration of some steroid hormones. *Anat. Rec.* **108**, 589-590

YOSHIKURA, M. (1959) Effects of high temperature on the gonad of hypophysectomized frog larvae. *Kumamoto J. Sci. Ser. B., Sec. 2*, **4**, 69-101

ZELLNER, A., KALBFUS, W. (1997) Belastung bayerischer Gewässer durch Nonylphenole. In: Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser. Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Wasserforschung (Hrsg.). *Oldenbourg Verlag*, Bd. **50**, 55-64

Danksagung

Für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die stets gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz danken.

Insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. Julia Schwaiger für ihr Engagement bei der Betreuung, ihre freundschaftliche und positive Unterstützung sowie die kritische Durchsicht der Arbeit.

Herrn Hermann Ferling danke ich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung sowie der statistischen Auswertung.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Wasserforschung in Wielenbach, die durch ihre freundliche und großzügige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Negele und Frau Ulrike Mallow.

Frau Christine Neumüller danke ich sehr herzlich für die Unterstützung bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung sowie Frau Gaby Rußmeier für die Hilfe bei der Immunhistochemie.

Zudem danke ich ganz herzlich meinem Freund Jens für die Hilfe bei der Arbeit am Computer sowie für seine moralische Unterstützung und Geduld während schwieriger Phasen. Verena danke ich für die Korrektur der Summary und Xenia für die abschließende Durchsicht meiner Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Cornelia Steineck

Geburtsdatum: 18. Oktober 1974

Geburtsort: Fritzlar

Familienstand: ledig

Eltern: Werner Steineck

Elisabeth Steineck, geb. Wippermann

Schulbildung:

1981-1985 Grundschule Lohne

1985-1991 Ursulinenschule Fritzlar

1991-1994: König-Heinrich-Schule Fritzlar mit abschließender
Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Studium:

1994-2000: Studium der Tiermedizin an der Tiermedizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München

Staatsexamen:

9. Februar 2000

Approbation:

10. März 2000

Februar 2000:

Beginn der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation

März 2002:

Assistentin in der Tierarztpraxis Dr. Wiest, Pfarrweisach