

ABSCHLUSSBERICHT

zu Händen

Baden-Württemberg Programm Lebensgrundlage

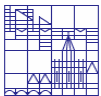
Umwelt und ihre Sicherung

(BWPLUS)

Toxikologische Untersuchungen zur Biokonzentration von Humanpharmaka und ihren Effekten auf das Immunsystem in Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) (BWB21002)

**Birgit Höger¹, Bernd Köllner², Daniel R. Dietrich¹, Daniela Schmid¹,
Annika Linke¹, Jörg Metzger³ und Bettina Hitzfeld^{4*}**

¹Umwelttoxikologie,
Universität Konstanz



⁴Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft
BUWAL, Bern



²Friedrich-Löffler-Institut,
Greifswald-Insel Riems



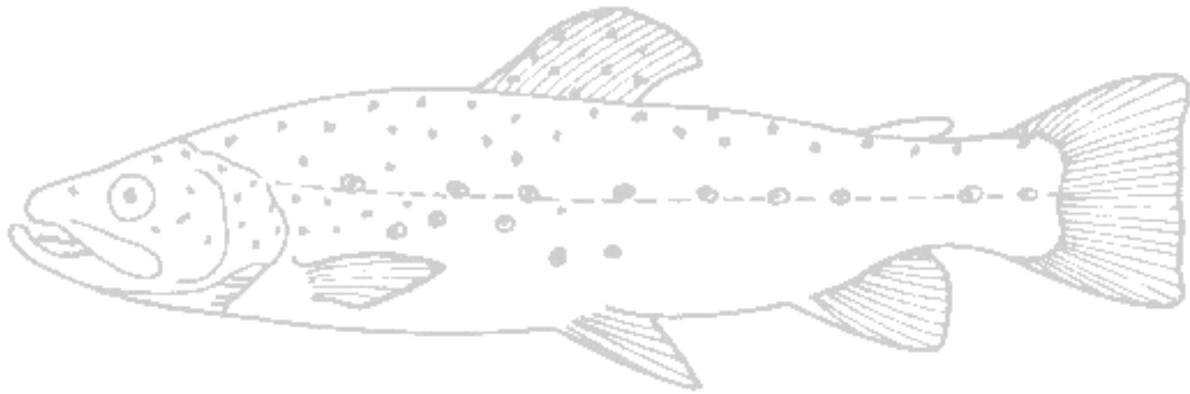
³Institut für Siedlungswasserbau,
Wassergüte- und Abfallwirtschaft
Universität Stuttgart



*Bettina.Hitzfeld@buwal.admin.ch

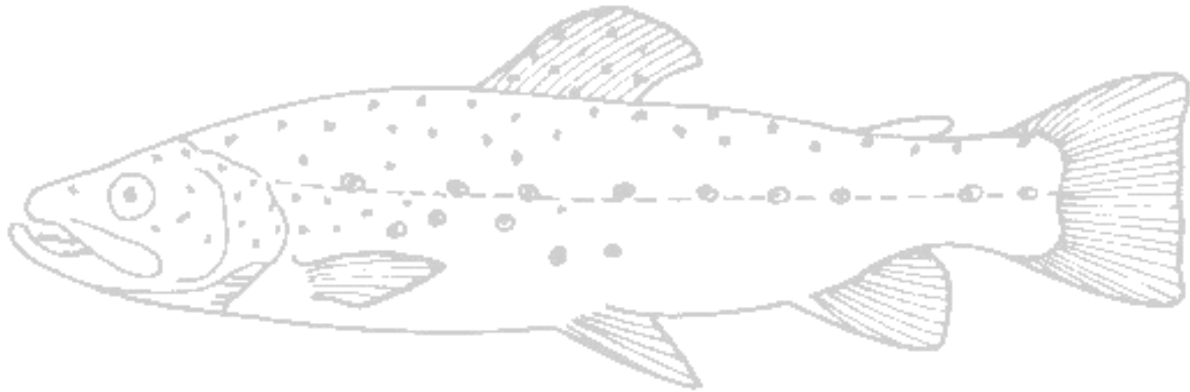
Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Summary	4
Danksagung	5
1. Einleitung	6
2. Material und Methoden	9
2.1. Aufnahme und Verteilung von Diclofenac	9
2.2. Verteilungskinetik von i.p.-injiziertem ¹⁴C-Diclofenac	9
2.3. Metabolismus von i.p.-injiziertem ¹⁴C-Diclofenac	10
2.4. Diclofenac Konjugate in Galle: LC-MS Analyse	10
2.5. Durchflusseexposition von Bachforellen mit Diclofenac	11
2.5.1. Versuchsaufbau	11
2.5.2. Analyse von Diclofenac in Wasserproben mittels ELISA	11
2.5.3. Blutparameter	12
2.5.4. Serum Lysozym Aktivität	12
2.5.5. Histologie	12
2.5.6. Immunhistologischer Nachweis einzelner Leukozyten-Populationen in Organproben	13
2.6. Inhibierung der Cyclooxygenase in Makrophagen	14
2.7. Statistik	14
3. Ergebnisse	15
3.1. Aufnahme und Verteilung von Diclofenac	15
3.2. Verteilungskinetik von i.p.-injiziertem ¹⁴C-Diclofenac	16
3.3. Metabolismus von i.p.-injiziertem ¹⁴C-Diclofenac	18
3.4. Diclofenac Konjugate in Galle: LC-MS Analyse	18
3.5. Durchflusseexposition von Bachforellen mit Diclofenac	19
3.5.1. ELISA Analyse der Diclofenac-Konzentrationen in den Expositionsaquarien	19
3.5.2. Hämatokrit und Leukokrit	19
3.5.3. Serum Lysozym Aktivität	19
3.5.4. Histopathologische Veränderungen in Kieme, Restniere und Leber	21
3.5.5. Immunhistologischer Nachweis einzelner Leukozyten-Populationen in Organproben	23
3.6. Cyclooxygenase-Inhibierung in Makrophagen	26
4. Diskussion	27
5. Literatur	32
6. Kongressbeiträge und Publikationen	34



Zusammenfassung

Diclofenac gehört zu den am häufigsten in der aquatischen Umwelt gefundenen Pharmaka. Der konstante Eintrag von Diclofenac in Oberflächengewässer über Kläranlagen führt zu einer chronischen Exposition aquatischer Lebewesen mit Konzentrationen im niedrigen $\mu\text{g/L}$ Bereich. Da Pharmaka die Eigenschaft besitzen spezifisch in bestimmte Regulationsmechanismen einzugreifen, können schon niedrige Konzentrationen zu leichten Veränderungen physiologischer Vorgänge führen. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Exposition von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) mit Diclofenac-Konzentrationen im Bereich der in Oberflächengewässern vorliegenden Werte, zu verminderten Hämatokrit-Werten und histopathologischen Veränderungen in Kieme, Niere und Leber führen kann. Verteilungskinetiken mit einer einmaligen Dosis i.p.-injiziertem ^{14}C -Diclofenac zeigten, dass Diclofenac in Fischen einen enterohepatischen Zyklus eingeht und somit nicht vollständig ausgeschieden wird. Entsprechend liegt die Vermutung nahe, dass Diclofenac unter chronischen Expositionsbedingungen in den Bachforellen akkumulieren kann. Versuche zur Hemmung der Prostaglandin E_2 -Synthese in Kopfnieren-Makrophagen deuten darauf hin, dass Diclofenac in Bachforellen denselben Wirkmechanismus verfolgt, wie bereits für Säugetiere beschrieben.



Summary

As a consequence of its extensive use in human medicine, diclofenac may be found ubiquitously in surface waters. The continuous contamination of surface waters with diclofenac via sewage treatment plant effluents leads to chronic diclofenac exposure of aquatic organisms with concentrations ranging in the low $\mu\text{g/L}$ level. As pharmaceuticals are tailored to specifically influence regulatory mechanisms, subtle effects on physiological functions can be expected even at low-levels of exposure. The present study demonstrated, that exposure of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) to diclofenac concentrations that may be observed in our surface waters leads to a decrease in haematocrit levels and histopathological alterations in gills, trunk kidney and liver. Distribution kinetics with a single i.p.-injection of ^{14}C -diclofenac demonstrated that diclofenac undergoes enterohepatic cycling in brown trout and is thus not readily excreted but may remain in the organism for an extended period of time. These findings suggest that, despite its low bioconcentration factor, diclofenac could accumulate in brown trout under a chronic exposure scenario, such as in surface waters. *In vitro* studies with head kidney macrophages demonstrated that diclofenac inhibits the induction of prostaglandin E_2 synthesis and thus follows a similar mechanism of action as has been described for mammalian species.

Danksagung

An erster Stelle möchten wir uns bei BWPLUS für die grosszügige Unterstützung dieses Forschungsprojektes bedanken. Insbesondere möchten wir uns bei der Projektträgerschaft von BWPLUS und ganz besonders bei PD Dr. Harald Krug für die Flexibilität und ständige Gesprächsbereitschaft während der Durchführung des Projektes bedanken.

Den GutachterInnen danken wir für die kritischen und konstruktiven Diskussionen während der Statusseminare in Karlsruhe, von denen wir sehr guten Input und viele neue Ideen für das Projekt bekommen haben.

Bei Novartis AG möchten wir uns für die grosszügige Gabe von ^{14}C -Diclofenac bedanken.

Bei Dr. Dietmar Knopp, Technische Universität München, möchten wir uns für Diclofenac-spezifische Antikörper und Diclofenac-Schwein Thyroglobulin (TG)- Konjugat zur Durchführung des Diclofenac ELISA bedanken.

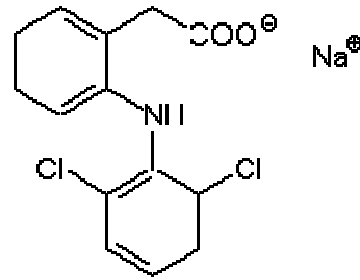
Wir bedanken uns sehr herzlich bei Momo Arsic (AG Biochemie, Universität Konstanz) für die Durchführung der LC-MS Analysen der Diclofenac Konjugate in Galleproben.

Für technische Hilfe möchten wir uns bedanken bei Martin Zieger und Nadine Richter, Umwelttoxikologie, Universität Konstanz; bei Sabine Weber, Helga Noak, Gabriele Czerwinski und Jens Peter Teifke, Friedrich-Löffler-Institut, Greifswald-Insel Riems.

1. Einleitung

Der Fokus der Umwelttoxikologie hat sich in den letzten Jahren weg von klassischen Schadstoffen (Schwermetallen, PCBs, etc.) hin zu so genannten „emerging contaminants“ oder „Mikroverunreinigungen“ verlagert. Zu diesen neu erkannten potentiellen Schadstoffen gehören auch die humanen Arzneimittel, die über diverse Eintragspfade in Oberflächengewässer gelangen können. Kommunale Kläranlagen sind die wichtigste Punktquelle für humane Arzneimittel in Oberflächengewässern (für einen Überblick siehe Kümmerer 2004). Abwässer aus Kläranlagen aber auch Oberflächengewässer enthalten Pharmaka diverser Substanzklassen wie z.B. nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs), Betablocker, Hormone, Psychopharmaka, Cytostatika oder Lipidsenker im ng-µg/l Bereich. Auch im Grund- und Trinkwasser wurden häufig Rückstände dieser Stoffe gefunden, allerdings geringen Konzentrationen. Hierbei ist die Situation in allen untersuchten Ländern Europas oder Nordamerikas ähnlich. Ein wichtiger Faktor beim Eintrag von Pharmaka über Kläranlagen sind einerseits die Substanzeigenschaften bezüglich Abbaubarkeit und andererseits die technische Ausrüstung der Kläranlage (Ternes et al. 2004). Hier spielen die Sorption an den Klärschlamm und die biologische Abbaubarkeit eine wesentliche Rolle. So adsorbieren z.B. viele saure Pharmaka wie die Schmerzmittel Ibuprofen oder Acetylsalicylsäure nur sehr wenig an Klärschlamm. Das Schlammalter spielt eine Rolle bei der Abbaubarkeit der Pharmaka, möglicherweise aufgrund der Diversifizierung der mikrobiellen Population oder aufgrund der Diversifizierung der metabolischen Aktivität durch den geringeren organischen Anteil im Schlamm. So wird z.B. Diclofenac nur dann zu einem erheblichen Anteil abgebaut, wenn das Schlammalter >8 Tage beträgt. Da aber viele europäische oder nordamerikanische Kläranlagen nicht auf die Elimination von Pharmaka hin optimiert sind, werden weiterhin erhebliche Frachten an Humanpharmaka über die Kläranlagen in die Vorfluter und Oberflächengewässer eingeleitet.

Diclofenac ([2-(2,6-Dichloranilino)phenyl]essigsäure) (Abb. 1) gehört zu der Gruppe der Arylessigsäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 296,15 g/mol (freie Säure) bzw. 318,1 g/mol (Na-Salz). Diclofenac wird in der Regel als Natriumsalz zubereitet (Natrium[2-(2,6-Dichloranilino)phenyl]acetat). Laut EPI SuiteTM besitzt Diclofenac einen $\log K_{ow}$ von 4,02 (KOWWIN) bzw. 4,51 (Experte) und Diclofenac-Natrium 0,57 bzw. 0,7. Der Biokonzentrationsfaktor (BCF; BCFWIN) wird mit 3,162 ($\log K_{ow}$ 4,51) angegeben.



Diclofenac-Natrium

Abbildung 1

Mit einem Verbrauch von 75 t pro Jahr gehört Diclofenac in Deutschland zu einem der am häufigsten angewandten Medikamente. Als Folge dieser umfangreichen Anwendung und eines unvollständigen Abbaus während der Kläranlagenpassage können Rückstände dieses nicht-steroidalen Antiphlogistikums (NSAID) mittlerweile regelmäßig in Oberflächengewässern nachgewiesen werden. In Flüssen und Seen wurden bislang Konzentrationen im niedrigen µg/L Bereich gefunden (Ternes, 1998; Lehmann, 2000).

Das ökotoxikologische Risiko von Diclofenac für Wasserorganismen ist bislang nur unzureichend untersucht. Die bisher durchgeführten Untersuchungen deuten auf ein eher geringes akutes ökotoxikologisches Risiko hin; (sub)chronische Untersuchungen lagen allerdings bisher keine vor. In einem worst case Szenario (kein Metabolismus, keine Elimination in der Kläranlage, 10fache Verdünnung im Vorfluter) wurde für Diclofenac ein PEC/PNEC (predicted environmental concentration/predicted no effect concentration) Verhältnis von 3,16 gefunden (Jones et al. 2002). Eine andere Studie, die sowohl akute wie auch chronische Endpunkte berücksichtigte, fand dagegen für Diclofenac ein PEC/PNEC Verhältnis <1 (Ferrari et al. 2004)

Diclofenac hemmt einerseits die Cyclooxygenasen, aber auch Lipoxygenase und führt zu einer Verminderung der freien Arachidonsäuren, welche durch eine Freisetzungshemmung und der Forcierung der Wiederaufnahme zu erklären ist. Diese dreifache Wirkung von Diclofenac ist unter den NSAIDs ungewöhnlich. Die Hemmung der Cyclooxygenasen (COX) führt unter anderem zu einer Veränderung der Prostaglandin-Konzentrationen. Da Prostaglandine neben ihrer schmerzhemmenden und anti-entzündlichen Wirkung auch eine Rolle in der Regulierung der Blutbildung, Blutgerinnung und Nierenaktivität spielen, ergeben sich aus der COX-Hemmung eine Vielzahl möglicher unerwünschter Wirkungen. Die Expression von COX wurde

bereits auch in Fischen nachgewiesen (Zou et al., 2000; Grosser et al., 2002). Dies weist auf die Möglichkeit hin, dass Diclofenac in diesen Vertebraten ähnliche Wirkungen hervorrufen könnte wie bereits für Säugetiere beschrieben.

Voraussetzungen für eine Wirkung in aquatischen Organismen sind die Aufnahme der Substanz aus dem Wasser und die Verteilung im Körper. Schwaiger et al. (2004) konnten bereits zeigen, dass Diclofenac aus dem Wasser aufgenommen und zu einem gewissen Maße in Fischgeweben angereichert wird. In unseren Studien wurde mit Hilfe von ^{14}C -markiertem Diclofenac die zeitabhängige Verteilung von Diclofenac in Bachforellen bis zu 36 Stunden nach intraperitonealer Applikation untersucht. Die Erstellung einer solchen Verteilungskinetik kann z.B. Hinweise auf Metabolisierungsmechanismen geben, wie etwa die Konjugation von Diclofenac und Aufnahme in die Gallenflüssigkeit. So ist bereits bekannt, dass Diclofenac in Säugetieren nach Konjugation im Zuge des Phase II Metabolismus zum Teil als Diclofenac-Konjugat in die Galle gelangt, von wo es in den Darm abgegeben wird. Das Diclofenac-Glucuronid Konjugat kann im Darm durch bakterielle Aktivität gespalten werden, und das nun freie Diclofenac kann wieder zurück in die Leber gelangen (enterohepatischer Zyklus).

Toxikologische Effekte von, in Oberflächengewässern auftretenden Diclofenac-Konzentrationen auf eine einheimische Salmoniden-Art wurden unter Anwendung eines Durchflusssystems untersucht. Hierbei wurden Bachforellen über einen Zeitraum von 21 Tagen unter ständiger Substanzerneuerung exponiert. Dadurch konnte ein kontinuierlicher Eintrag, wie er im Falle von Kläranlagenabwasser stattfindet, nachempfunden werden. Die Forellen wurden nach 7, 14 und 21 Tagen auf Veränderungen in den grundlegenden Blutparametern Hämatokrit und Leukokrit, sowie auf Auswirkungen auf die Serum Lysozym Aktivität, die der Abwehr von bakteriellen Infektionen dient, untersucht. Nach 21 Tagen wurden darüber hinaus Kieme, Leber, Milz, Kopfnieren, Restnieren und Darm auf histopathologische Veränderungen untersucht. Immunhistologie mit spezifischen Antikörpern machte in diesem Zusammenhang den Nachweis verschiedener Leukozyten-Populationen in diesen Geweben möglich.

2. Material und Methoden

2.1. Aufnahme und Verteilung von Diclofenac

Diese Versuche wurden im Zwischenbericht 2003 an die Projektträgerschaft und im Statusseminar detailliert beschrieben. Im vorliegenden Abschlussbericht sollen sie nur der Vollständigkeit halber erwähnt und kurz beschrieben werden.

Für die Methodenentwicklung wurde Bachforellen zuerst 0,949 mg Diclofenac/ml intraperitoneal gespritzt. Nach 4 und 20 Stunden (1. Versuch) bzw. 0,5 bis 3 Stunden (2. Versuch) wurden die Fische getötet und Organe (Leber, Niere, Muskel, Kieme, Blut, Serum) entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ebenso wurden aus den Aquarien Wasserproben entnommen. Nachdem die Analytik von Diclofenac mit GC-MS an der Universität Stuttgart anhand dieser Versuche etabliert war, wurden Expositionsversuche im Durchflusssystem durchgeführt. Hierfür wurden Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) mit 1 und 10 µg/l Diclofenac für 14 Tage exponiert. In der 28tägigen Clearance Phase wurden die Fische beprobt und die Organe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ausserdem wurden Wasserproben genommen. Die Diclofenac Analytik erfolgte nach der Extraktion, Anreicherung (Anreicherung nur für Blut, Serum, Wasser) und Derivatisierung von Diclofenac mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) als Diclofenac-Methylester quantitativ im GC-MS.

2.2. Verteilungskinetik von i.p.-injiziertem ¹⁴C-Diclofenac

Da die GC-MS Analytik von Diclofenac in den Expositionsversuchen nicht die gewünschte Sensitivität erbracht hatte, wurden Versuche mit ¹⁴C-markiertem Diclofenac durchgeführt. Etwa 1 Jahr alten Bachforellen (*S. trutta f. fario*, Fischzucht Peter Störk, Wagenhausen/ Bad Saulgau) wurde intraperitoneal (i.p.) je 6,2 µg ¹⁴C-markiertes Diclofenac-Natriumsalz (freundlicherweise von Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz zur Verfügung gestellt), mit einer Aktivität von 70,5 kBq, injiziert (injiziertes Volumen 0,5 ml). Je 3 Fische wurden für 45 min, 3, 6, 12, 24 oder 36 h einzeln in Aquarien gehalten. Zur Erfassung der ausgeschiedenen Radioaktivität wurden in regelmäßigen Abständen Wasserproben entnommen. Nach Ablauf der jeweiligen Expositionszeit wurden 30 µl Blut, die Galle, sowie Stücke von Leber, Milz, Kopfnieren, Restnieren, Magen, Pylorus, Darm, Kieme und Muskel in Szintillationsgefäße überführt, gewogen (Frischgewicht zw. 100 und 300 mg) und für 48 h mit 1 ml NCS-II Tissue Solubilizer (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) inkubiert. Nach Verdau der Proben und Zugabe von Essigsäure und Szintillationscocktail für organische Proben (BCS-NA counting scintillant, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) wurde die ¹⁴C-Aktivität im Szintillationszähler (LS 6500

multi-purpose scintillation counter, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) als Zerfall pro Minute (dpm) gemessen. Die ^{14}C -Aktivität in Becquerel wurde ermittelt durch Division der dpm-Werte mit dem Faktor 60. Für die Berechnung der Wiederfindungsrate in Blut und Muskel wurde angenommen, dass eine durchschnittliche Forelle 3,5 ml Blut / 100 g Körpergewicht enthält (Itazawa et al., 1983; Tort et al., 1991) und die Muskelmasse etwa 60 % des Körpergewichts ausmacht. Der gesamte Kinetik-Versuch wurde einmal wiederholt.

2.3. Metabolismus von i.p.-injiziertem ^{14}C -Diclofenac

Zum Nachweis einer Phase II-Konjugation von Diclofenac wurden Galleproben in einer Dünnschichtchromatographie analysiert, was die Untersuchung der Laufeigenschaften des in der Galle enthaltenen ^{14}C -Diclofenac ermöglichte. Zwei Bachforellen (Alter ca. 1 Jahr) wurde jeweils 6,15 μg (70.45 kBq) ^{14}C -Diclofenac in 0,9 % Saline i.p. injiziert (injiziertes Volumen 0,5 ml). Nach 6 h wurde den Fischen die Galle entnommen, die schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt wurde. Die folgenden Proben wurden auf eine Dünnschichtchromatographie (DC) Aluminium Platte mit Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA, Darmstadt) aufgetragen: 1) Galle einer unbehandelten Forelle als Negativkontrolle 2) mit 40 kBq ^{14}C -Diclofenac-Stammlösung versetzte Galle einer unbehandelten Forellen 3) Galle einer ^{14}C -Diclofenac behandelten Forelle 4) ^{14}C -Diclofenac Stammlösung (40 kBq), 5) Galle einer ^{14}C -Diclofenac behandelten Forelle, nach Inkubation der Gallenprobe mit 25 Units β -Glucuronidase (aus *E. coli*, Sigma, Steinheim) für 1 h. Die Chromatographie wurde in einer prä-equilibrierten DC-Kammer mit einer Mischung aus Dichlormethan, Methanol (8,5 : 1,4 Anteile) und 0.25 % Ammoniak durchgeführt. Nach 1 h 30 min wurde die DC-Platte getrocknet und für 60 h auf einer Phosphor Imager Platte inkubiert, gefolgt von der Detektion der ^{14}C -Aktivität in einem Phosphor Imager.

2.4. Diclofenac Konjugate in Galle: LC-MS Analyse

Zur weiteren Identifikation möglicher Diclofenac-Konjugate in der Galle, wurden Expositionsanalysen im Durchfluss mit anschließender LC-MS Analytik durchgeführt. Die Exposition erfolgte wie unter 2.5.1. beschrieben, wobei für diesen Versuch nur Gallenproben der Tiere der 50 $\mu\text{g}/\text{l}$ Gruppe verwendet wurden. Gallen von drei Forellen wurden gepoolt, in 50% Methanol gevortext und abzentrifugiert. Liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS) wurde an einem Alliance HT model 2695 LC System (Waters Corp.) mit Micromass QUATTRO micro mass spectrometry System (Micromass, Manchester, UK) und MassLynx NT Version 4.0 Software durchgeführt. Als mobile Phase A wurde 99,9% Wasser und

0,1 % Ameisensäure, als mobile Phase B 99,9% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure verwendet. Nach einer Injektion von 10 µl auf eine Tandem gekoppelte NovoGrom C18 Säule (40x1 mm; 1,5 µm) (Grom Chromatography GmbH) wurde mit 40 µl/min eluiert. Das Eluent wurde mittels electrospray ionization (ESI) analysiert (Flussrate 40 µl/min, 2,8 kV). Die Blocktemperatur betrug 150°C, die Desolvationstemperatur 220°C; Desolvationsgas: 300 l/h. Stickstoff wurde als Vernebelungs- und Trocknungsgas verwendet. Kalibration erfolgte über eine wässrige Cäsiumiodid Lösung.

2.5. Durchflusseexposition von Bachforellen mit Diclofenac

2.5.1. Versuchsaufbau

Etwa 1 ½ Jahre alte Bachforellen (*S. trutta f. fario*, Fischzucht Peter Störk, Wagenhausen/ Bad Saulgau) wurden in Bodenseewasser zu Gruppen von 36 Fischen in 360 L Aquarien gehalten. Nach einer Eingewöhnungsphase von 13 Tagen wurden die Fische in einem Durchflusssystem für 21 Tage 0,5, 5 bzw. 50 µg/L Diclofenac-Natriumsalz (Sigma, Steinheim) ausgesetzt. Eine Flussrate von 32 L/h ermöglichte dabei einen kompletten Wasseraustausch innerhalb von ca. 48 h. Zur Überprüfung der nominalen Diclofenac-Konzentration in den Expositionsaquarien wurden täglich Wasserproben entnommen und bis zur Analyse mittels Diclofenac-ELISA bei -20°C aufbewahrt. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden je 12 Fische pro Expositionsgruppe beprobt. Den Fischen wurde Blut aus der Caudalvene entnommen, das zur Bestimmung des Hämatokrit und Leukokrit und für Serumproben verwendet wurde. Darüber hinaus wurde Gewicht und Körperlänge der Fische protokolliert und anschließend zur Ermittlung des condition factors verwendet. Nach 21 Tagen Expositionszeit wurden zusätzlich zu den Blutparametern Proben von Kieme, Kopfniere, Restnieren, Darm, Leber und Milz für histopathologische Untersuchungen und immunhistologischen Nachweis verschiedener Leukozytenpopulationen in den Geweben entnommen.

2.5.2. Analyse von Diclofenac in Wasserproben mittels ELISA

Der ELISA zum Nachweis von Diclofenac in Wasserproben folgte der Beschreibung von Deng et al. (2003). Diclofenac-spezifische Antikörper und Diclofenac-Schwein Thyroglobulin (TG)-Konjugat (coating antigen) wurden freundlicherweise von Dr. Dietmar Knopp, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt. Alle Wasserproben wurden in drei unabhängigen ELISA-Durchläufen getestet. 96 well-Mikrotiter-Platten für ELISA (Nunc Maxisorp, Invitrogen, Karlsruhe) wurden über Nacht bei 4°C mit 20 ng/mL Diclofenac-TG coating Antigen in 0,05 M

Natrium-Carbonat Puffer (pH 9,6) inkubiert und anschließend 3x mit Waschpuffer (0,01 M phosphate balanced salt solution (PBS, pH 7,4), 0,1% Tween 20) gewaschen. Nach dem Blocken der ELISA-Platten mit 1% Casein in PBS (Sigma, Steinheim) für 1h bei RT und einem weiteren Waschzyklus, wurde mit je 100 µL/well Diclofenac-Standard (Diclofenac Stammlösung: 0,5 g/L Diclofenac in Methanol, seriell verdünnt in MilliQ-Wasser zu Konzentrationen von 0,01 – 10 µg/L) oder Wasserproben, gefolgt von 100 µL/well Kaninchen anti-Diclofenac Serum (1: 20.000 in PBS) auf einem Schüttler für 1 h bei RT inkubiert. Nach 3x Waschen wurde für 1h bei RT mit sekundären Antikörper Ziege anti-Kaninchen IgG-Peroxidase (Dako, Verdünnung in PBS 1:1000) inkubiert. Nach einem weiteren Waschzyklus wurde mit je 200 µL/well Tetramethylbenzolate (TMB liquid substrate, ready-to-use, Sigma, Steinheim) für ca. 20 min auf einem Schüttler inkubiert und die Reaktion anschließend mit 100 µL/well 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Farbreaktion wurde bei 450 nm in einem Plattenmessgerät (Reader 340 ATTC, SLT Labinstruments, Grödig, Österreich) ermittelt.

2.5.3. Blutparameter

Zur Bestimmung des Hämatokrit und Leukokrit wurden Heparin-beschichtete Mikrokapillaren (VWR International, Bruchsal) mit Blut befüllt, verschlossen und bei 12000 rpm, für 5 min in einer Biofuge haemo mit einem speziellen Hämatokrit-Rotor (Heraeus/Kendro Laboratory Products, Hanau) zentrifugiert. Hämatokrit und Leukokrit wurden mit Hilfe einer Hämatokrit-Harfe (Heraeus/Kendro Laboratory Products, Hanau) in Prozent des in die Kapillare gefüllten Blutvolumens abgelesen.

2.5.4. Serum Lysozym Aktivität

Die Absorption von 950 µl einer *Micrococcus lysodeikticus*-Lösung (Sigma, Steinheim) (0,5 mg/ml in 0,05 M Natrium-Phosphat Puffer, pH 6,2) wurde in einem Photometer gemessen. Nach Zugabe von 50 µl Serum wurde die Abnahme der Absorption, die aus der Lyse von *M. lysodeikticus* resultiert, über einen Zeitraum von 4 ½ min gemessen. Die Lysozym Aktivität wurde als Abnahme der optischen Dichte pro min angegeben.

2.5.5. Histologie

Organproben wurden zunächst für 3 h auf einem Schüttler in 4 % Paraformaldehyd (Extra pure, Sigma-Aldrich, Seelze) in Phosphat-Puffer nach Sörensen (0,1 M Kalium-Dihydrogen-Phosphat und 0,1 M Di-Natriumhydrogen-Phosphat, gemischt im Verhältnis 3 : 7; pH 7,3) fixiert. Danach wurde das Fixans gewechselt und die Proben über Nacht bei 4°C weiterfixiert, gefolgt von einem

weiteren Wechsel des Fixans. Die Proben wurden bis zur Paraffineinbettung bei 4°C aufbewahrt. Paraffineinbettung folgte einer Standardmethode. Serielle Schnitte mit einer Dicke von 4 µm wurden auf Objektträger aufgebracht, über Nacht bei 50 °C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Entparaffinisierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte erfolgte nach der folgenden Prozedur: 2 x 5 min in Rotihistol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 2 x 3 min in 100% n-Propanol, jeweils 3 min in 96, 80, 70 und 50% n-Propanol, gefolgt von einer kurzen Inkubation in MilliQ-Wasser. Ein Set der Schnitte wurde nach Standardprozedur mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und mit Hilfe eines Zeiss Axiolab Mikroskops (Carl Zeiss, Hallbergmoos) auf histopathologische Veränderungen untersucht.

2.5.6. Immunhistologischer Nachweis einzelner Leukozyten-Populationen in Organproben

Demaskieren der entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurde mit einer 1 : 1,7 Mischung von 0,01 M Zitratpuffer und 0,2 M Natrium-Dihydrogen-Phosphat Puffer für 20 min bei 120°C durchgeführt. Nach Abkühlen auf RT wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen und mit Starting BlockTM (TBS) Blocking Puffer (Pierce, Rockford, USA) für 30 min bei RT geblockt. Nach 3x Waschen wurden die Schnitte mit verschiedenen primären monoklonalen Antikörpern, verdünnt in Iscove's Modified Dulbecco's Medium, für 1h bei RT inkubiert. Zum immunhistologischen Nachweis von Leukozyten-Populationen in den Geweben wurden monoklonale Antikörper verwendet, die spezifisch an verschiedene Leukozyten-Populationen von Regenbogenforellen binden (Tabelle 1). Nach weiterem Waschen wurde für 1h bei RT mit Fluoreszenz-markiertem Sekundär-Antikörper (Ziege anti-Maus IgG/IgM-Alexa Fluor 488, MoBiTec, Göttingen) inkubiert, gefolgt von 3x Waschen, Eindeckeln der Schnitte mit 10% Glycerin und 2,5% 1,4-diazobicyclooctan (Dabco) (Sigma, Steinheim) in PBS und Untersuchung auf spezifische Fluoreszenz-Färbung mit Hilfe eines LSM 510 konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Carl Zeiss, Hallbergmoos). Die Schnitte wurden im konfokalen Modus mit einem 40x Ölimmersions-Objektiv gescannt. Die 488 nm Linie eines Argonlasers wurde für Alexa 488 Anregung verwendet. Die Fluoreszenz-Emission wurde bei 525 nm detektiert unter Verwendung eines Hauptstrahlenteilers bei 488/543 nm in Kombination mit einem zweiten Strahlenteiler bei 545 nm und einem Emissionsfilter bei 503-530 nm. Das konfokale Laser Scanning Mikroskop wurde an jedem Untersuchungstag mit Hilfe der jeweiligen Konjugat-Kontrolle abgestimmt, so dass keine unspezifische Hintergrundfluoreszenz verblieb und die Fluoreszenz-markierten Schnitte wurden daraufhin unter den gleichen Bedingungen, wie für die Konjugat-Kontrolle

eingestellt, gescannt. Die erhaltenen Scans wurden unter Verwendung der LSM 510/2.1 Software (Carl Zeiss, Hallbergmoos) analysiert. Pro Expositionsgruppe wurden Organproben von mindestens 4 Fischen untersucht. Unterschiede in der Grün/Rot-Intensität der Gewebe-Autofluoreszenz zwischen verschiedenen Proben sind auf Variationen in der Einstellung des Fluoreszenz-Scanners an verschiedenen Untersuchungstagen zurückzuführen.

Tabelle 1: Für die Immunhistologie verwendete monoklonale Antikörper

Zellpopulation/ Oberflächenmarker	Primärer Antikörper	Literaturzitat
MHC II	1E7	(Stachowski et al., 2004)
Granulozyten	Q4E	(Kuroda et al., 2000)
Thrombozyten	mAb22	(Köllner et al., 2004)

2.6. Inhibierung der Cyclooxygenase in Makrophagen

Zum Nachweis der Inhibierung der Cyclooxygenase durch Diclofenac wurden Makrophagen aus der Kopfniere von Bachforellen mittels einer Percoll-Gradienten-Zentrifugation isoliert (Secombes, 1990). Die Zellen wurden in 24 Well-Zellkulturplatten ausgesät (1×10^6 Zellen/well in 500 μ l Medium) und ca. 4 h bei 18°C stehen gelassen. Nach Inkubation der Makrophagen mit 5 μ g/ml LPS (*E. coli* Serotyp 0111:B4, Sigma, Steinheim) für 12 h, wurden die Zellen für 30 min mit 10-100 μ M Diclofenac vorbehandelt und anschließend mit 10 μ M Calcium-Ionophor A23187 für 20 min inkubiert. Als Maß für die COX-Aktivität wurden die Zellkulturüberstände mit Hilfe eines Enzymimmunassay (EIA) auf Prostaglandin E₂-Gehalt untersucht (Biotrak EIA, Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK).

2.7. Statistik

Statistische Analyse der Daten wurde mit SAS JMP Version 4.0.4 (SAS Institute Inc., Heidelberg) und GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Im Falle von Homogenität der Varianzen und Normalverteilung der Daten, wurde mit Hilfe von one-way ANOVA mit Dunnett's post test gegen die in Bodenseewasser gehaltene Kontrollgruppe auf Signifikanz der beobachteten Unterschiede getestet. Semi-quantitative Daten aus der Histopathologie wurden mit Kruskal-Wallis nicht-parametrischem ANOVA mit Dunn's multiple comparison test als post test getestet.

3. Ergebnisse

3.1. Aufnahme und Verteilung von Diclofenac

Diese Versuche wurden im Zwischenbericht 2003 an die Projektträgerschaft und im Statusseminar detailliert beschrieben und diskutiert. Im vorliegenden Abschlussbericht sollen sie nur der Vollständigkeit halber erwähnt und kurz diskutiert werden.

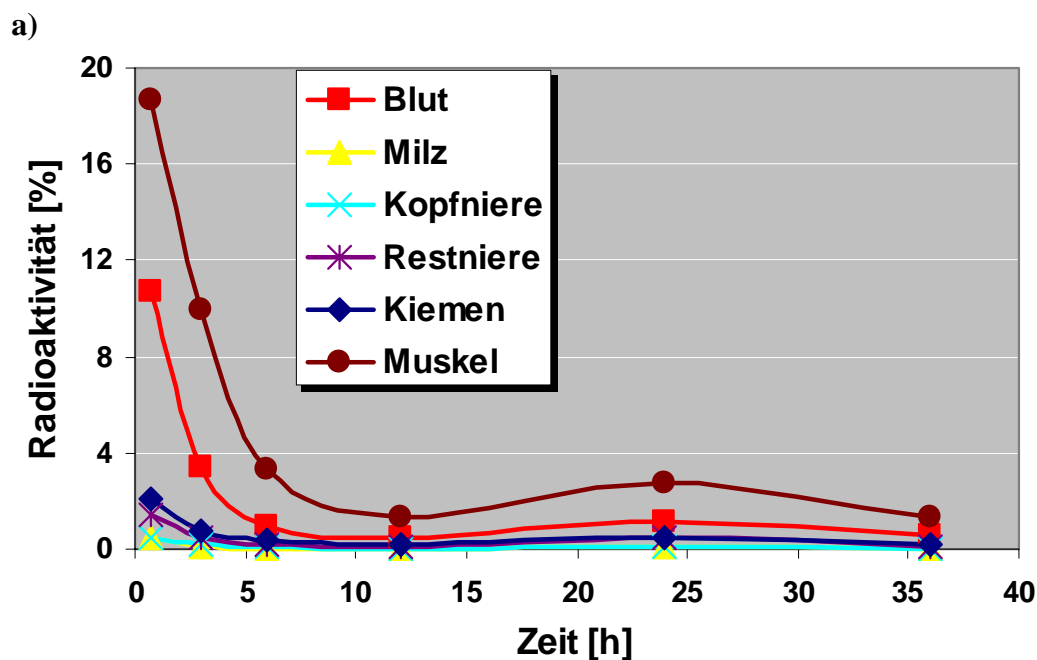
Die Ergebnisse der Spritzversuche mit 0,949 mg/ml Diclofenac i.p. zeigten, dass eine relativ schnelle Verteilung des Wirkstoffs im Fisch erfolgt. Bereits nach vier Stunden ist Diclofenac in allen untersuchten Organen zu finden. Die höchsten Konzentrationen wurden im Serum (11 µg/g Frischgewicht (FG)) und in der Leber (7-10 µg/g FG) festgestellt. Auch die Kopfnieren enthielten mit 5,3-6,4 µg/g FG relativ viel Diclofenac. Die Kiemen und Muskeln wiesen bereits deutlich geringere Gehalte von 1,4-2 µg/g FG bzw. 0,41-1,1 µg/g FG auf. Es zeigt sich in den Ergebnissen, dass Diclofenac relativ schnell metabolisiert und eliminiert wird, da die Konzentrationen in allen beprobten Organen nach 20 Stunden bereits deutlich abnahmen. Ein Diclofenac-Gehalt von 7,4 µg/l Aquariumwasser deutet ebenfalls auf eine Ausscheidung hin. Die Mengen an Wirkstoff 20 Stunden nach der Behandlung waren wie folgt: Leber 1,9-4,5 µg/g FG, Serum 1,3 µg/g FG, Kopfniere 0,4-2,7 µg/g FG, Kieme 0,12-0,65, Muskel <0,15-0,26 µg/g FG. Die Matrices der Kontrollfische wiesen allesamt Gehalte <0,4 µg/g FG auf.

Bachforellen, welche über das Umgebungswasser im Durchflussversuch mit 1 und 10 µg/l Diclofenac exponiert waren, zeigten nach 14 Tagen Exposition signifikant erhöhte Kopf- und Restnierengewichte, sowie einen erhöhten hepatosomatischen Index. Während des Expositionsversuches lag die Mortalitätsrate bei knapp 25% in beiden Dosisgruppen, wobei die Mortalität vorwiegend in der zweiten Hälfte der Expositionsphase und zu Beginn der Clearance Phase auftrat.

Die analysierten Proben der Fischmatrices aus dem Versuch mit 10 µg Diclofenac/l Expositions-konzentration wiesen allesamt Diclofenac-Gehalte unter der Bestimmungsgrenze (BG), zum größten Teil unterhalb der Nachweisgrenze auf. Lediglich in einer Leberprobe, entnommen am 1. Tag der Clearance Phase (t1), sowie in der Mischprobe der restlichen Leberproben von t1, waren Diclofenac-Gehalte von 0,057 und 0,042 µg/g Trockengewicht (TG) nachweisbar (BG = 0,1 und 0,05 µg/g TG).

3.2. Verteilungskinetik von i.p.-injiziertem ^{14}C -Diclofenac

Der überwiegende Teil des injizierten ^{14}C -Diclofenac wurde von den Bachforellen in das umgebende Wasser abgegeben. Über eine Expositionsdauer von 36 h wurde von den einzelnen Fischen zwischen 25 und 60 kBq freigesetzt, wobei nicht klar ist auf welchem Weg (über Urin, Darmausscheidung oder Kieme) das Diclofenac freigesetzt wurde (Abb. 2c). Innerhalb der ersten 6 h kam es in der Gallenblase zu einer Anreicherung von ^{14}C -Diclofenac (Abb. 2b). Im weiteren Verlauf (zwischen 6 und 24 h) wurde Diclofenac mit der Galle in den Pylorus abgegeben, von wo es in den Darm gelangte. In Folge (zwischen 24 und 36 h) zeigte sich eine Abnahme der Diclofenac-Konzentration in Pylorus und Darm, die mit einer erneuten Präsenz von ^{14}C -Aktivität (Diclofenac) in der Gallenblase einherging. Im Zeitraum zwischen 6 und 24 h nach Injektion war darüber hinaus eine gesteigerte Ausscheidung von Diclofenac aus dem Organismus zu beobachten, die nach 24 h abflachte.



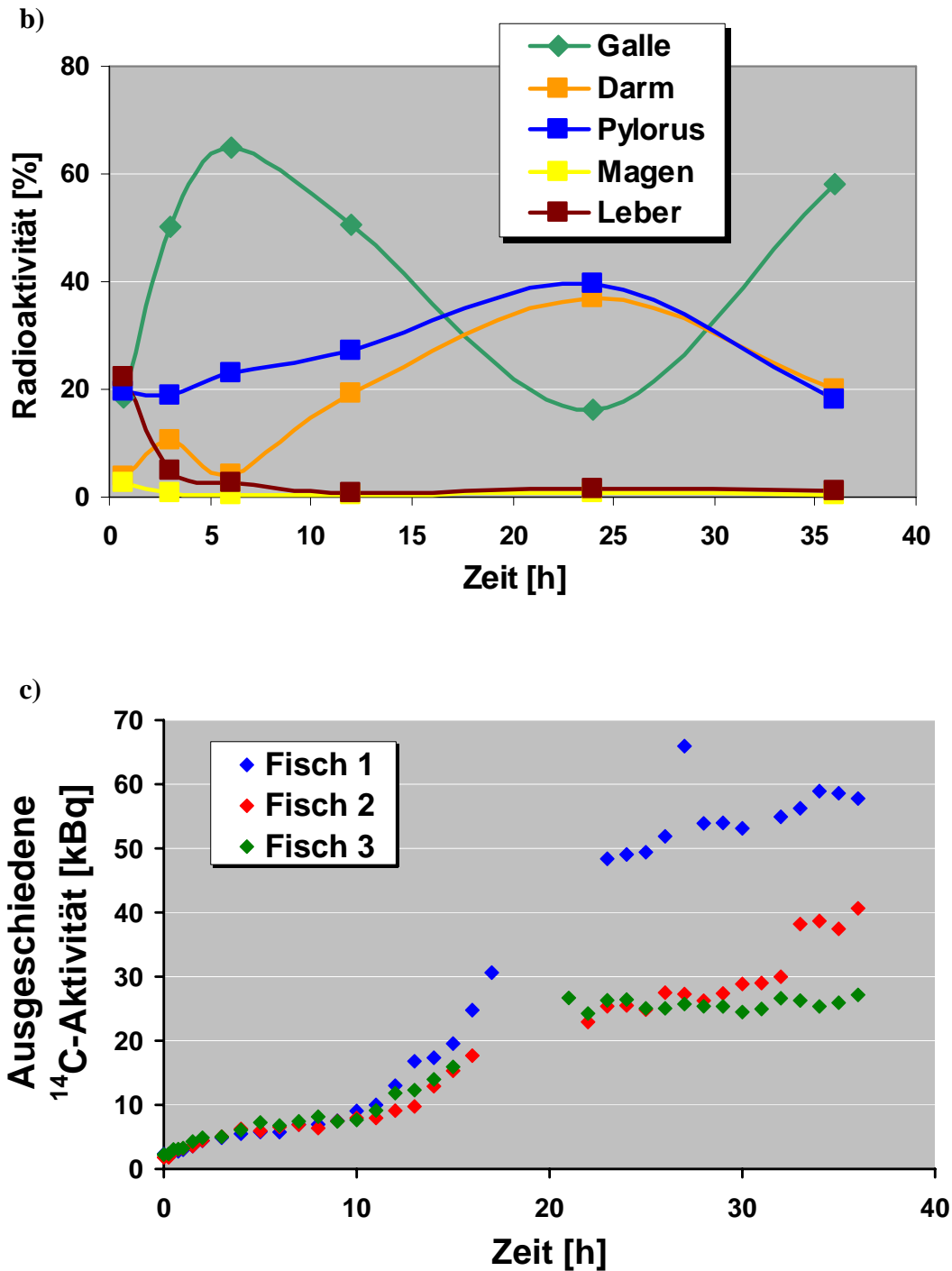


Abbildung 2: a) und b) Verteilungskinetik von ¹⁴C-Diclofenac in Organproben, angegeben in Prozent der gesamten im Organismus wiedergefundenen Radioaktivität. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 Fischen aus einem der zwei Versuchsreplikate.
c) In das Wasser ausgeschiedene Radioaktivität im Verlauf von 36 h nach i.p.-Injektion mit ¹⁴C-Diclofenac.

3.3. Metabolismus von i.p.-injiziertem ^{14}C -Diclofenac

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie konnte gezeigt werden, dass ^{14}C -Diclofenac in der Galle in konjugierter Form vorliegt, was zu einer Verminderung der Laufeigenschaften des Diclofenac führte (Abb. 3). Zugabe von β -Glucuronidase zu einer Galleprobe ergab einen Hinweis auf eine Glucuronidierung von Diclofenac im Laufe der Phase II Metabolisierung, da die Bande des konjugierten ^{14}C -Diclofenac mit verminderten Laufeigenschaften nach Glucuronidase-Behandlung verschwand (Abb. 3e).

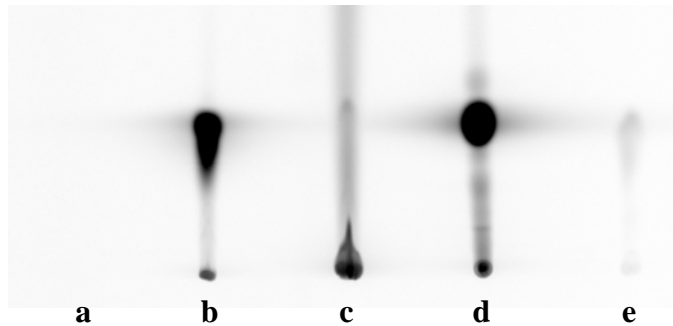


Abb. 3: Dünnschichtchromatographie zum Nachweis von konjugiertem Diclofenac in Galleproben. a) Kontroll-Galle einer unbehandelten Forelle, b) Galle einer unbehandelten Forelle versetzt mit 40kBq ^{14}C -Diclofenac Stammlösung, c) Galle einer ^{14}C -behandelten (i.p.-injizierten) Forelle, d) ^{14}C -Diclofenac-Standard, e) Galle einer ^{14}C -injizierten Forelle nach Inkubation mit β -Glucuronidase.

3.4. Diclofenac Konjugate in Galle: LC-MS Analyse

Die Spektren der LC-MS Analyse der Galleproben sind in der Auswertung und werden derzeit noch diskutiert. Das Manuskript zu diesen Ergebnissen ist in Vorbereitung und wird der Projektträgerschaft nach Annahme zur Verfügung gestellt (s. 6. Kongressbeiträge und Publikationen).

3.5. Durchflusseexposition von Bachforellen mit Diclofenac

3.5.1. ELISA Analyse der Diclofenac-Konzentrationen in den Expositionsaquarien

Die ELISA Analyse der täglichen Wasserproben zeigte tatsächliche mittlere Diclofenac-Konzentrationen (\pm Standardabweichung) in den Expositionsaquarien von $1,15 \pm 0,37$, $6,63 \pm 1,08$ und $63,05 \pm 5,61$ $\mu\text{g/L}$ für die nominalen Konzentrationen von 0,5, 5 und 50 $\mu\text{g/L}$. Die Diclofenac-Konzentration in den Bodensee-Wasserproben aus dem Referenzaquarium lagen unter dem für den ELISA angegebenen Detektionslimit von 20 ng/L (Deng et al., 2003).

3.5.2. Hämatokrit und Leukokrit

Bachforellen zeigten nach 7 Tage Exposition mit den nominalen Diclofenac-Konzentrationen von 0,5 und 50 $\mu\text{g/L}$, sowie nach 14 Tagen Exposition mit allen 3 Konzentrationen signifikant verminderte Hämatokrit-Werte (Abb. 4). Nach 21 Tagen zeigten Diclofenac-exponierte Fische keine signifikant niedrigeren Hämatokrit-Werte mehr im Vergleich zu den Kontrolltieren. Allerdings waren die Hämatokrit-Werte der nach 21 Tagen beprobten Kontrolltiere ebenfalls niedriger als die Werte der nach 7 und 14 Tagen beprobten Kontrolltiere, wobei dieser Effekt nicht statistisch signifikant war. Exposition mit Diclofenac hatte keine Auswirkungen auf die Leukokrit-Werte in Bachforellen, mit Ausnahme der mit 0,5 $\mu\text{g/L}$ Diclofenac exponierten Fisch, die nach 14 Tagen gegenüber den Kontrolltieren statistisch signifikant verminderte Leukokrit-Werte zeigten (Abb. 5).

3.5.3. Serum Lysozym Aktivität

Diclofenac führte nicht zu einem eindeutigen Effekt auf die Serum Lysozym Aktivität in den exponierten Bachforellen. Obwohl die Exposition mit 0,5 $\mu\text{g/L}$ Diclofenac für 7 Tage in signifikant niedriger Lysozym Aktivität und Exposition mit 5 $\mu\text{g/L}$ Diclofenac zu einer statistisch signifikanten Stimulierung der Serum Lysozym Aktivität nach 21 Tagen führte, werden diese Unterschiede aufgrund einer fehlenden Dosis-Wirkungs- sowie Dosis-Zeit-Kurve nicht als biologisch relevant gewertet (Abb. 6).

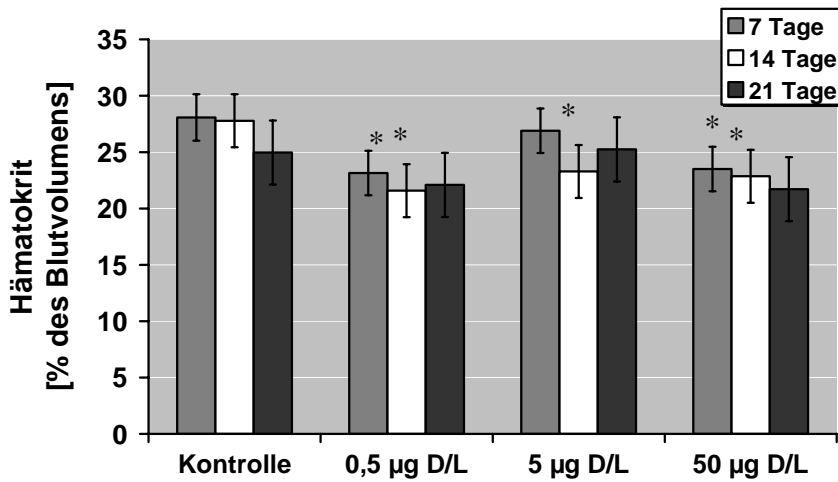


Abb. 4: Hämatokrit in Prozent des gesamten Blutvolumens nach Exposition mit 0,5; 5 oder 50 µg/L Diclofenac für 7, 14 und 21 Tage. Gezeigt sind Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall (CI). Daten wurden mit one-way ANOVA mit Dunnett's post test getestet. $N \geq 11$; * $p \leq 0,05$.

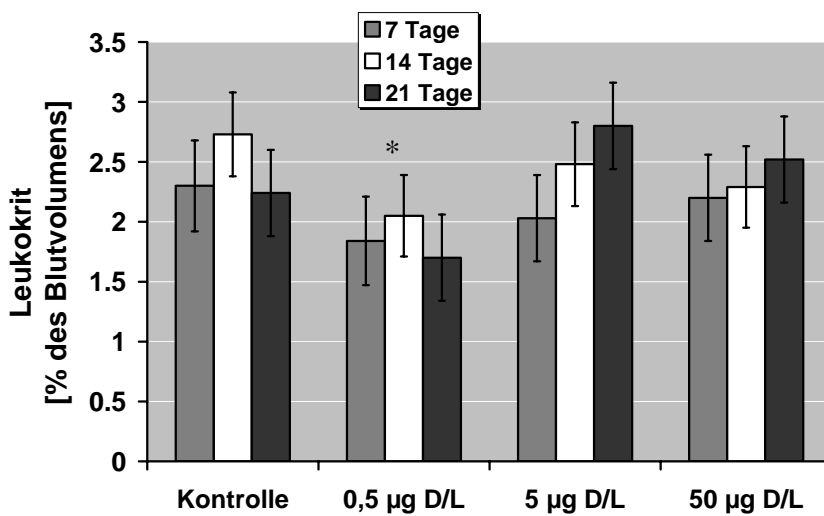


Abb. 5: Leukokrit in Prozent des gesamten Blutvolumens nach Exposition mit 0,5; 5 oder 50 µg/L Diclofenac für 7, 14 und 21 Tage. Gezeigt sind Mittelwerte mit 95% CI. Daten wurden mit one-way ANOVA mit Dunnett's post test getestet. $N \geq 11$; * $p \leq 0,05$.

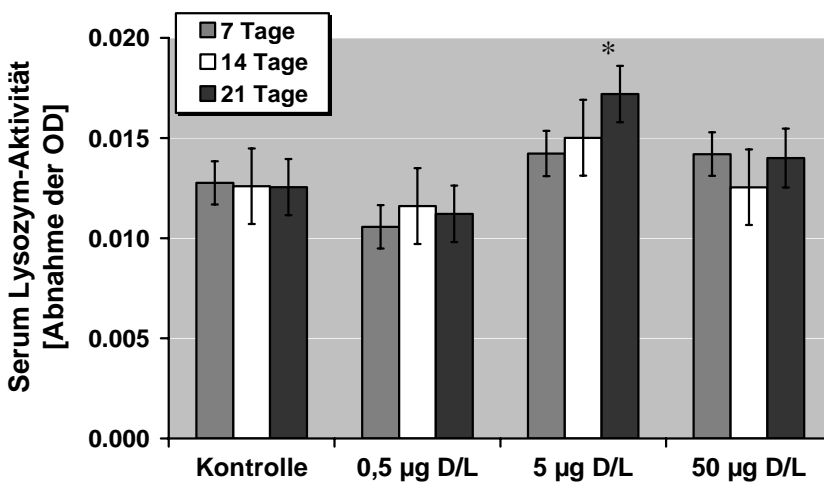


Abb. 6: Serum Lysozym-Aktivität, gemessen als Abnahme der optischen Dichte (OD) einer *M. lysodeikticus*-Lösung, nach Exposition mit 0,5; 5 oder 50 µg/L Diclofenac für 7, 14 und 21 Tagen. Gezeigt sind Mittelwerte mit 95% CI. Daten wurden mit one-way ANOVA mit Dunnett's post test getestet. $N \geq 11$; * $p \leq 0,05$.

3.5.4. Histopathologische Veränderungen in Kieme, Restniere und Leber

Exposition mit Diclofenac über einen Zeitraum von 21 Tagen führte in allen Expositionsgruppen zu einer milden bis moderaten Degeneration von Pillarzellen der sekundären Kiemenlamellen (Telangiectasis) (Tabelle 2). Exposition mit 50 µg/L Diclofenac führte weiter zu einem signifikant erhöhten Auftreten keulenartiger Verdickungen der sekundären Kiemenlamellen. Darüber hinaus konnten einige Fälle von Hyperplasie der Epithelialzellen, verdickten Lamellenspitzen und Fusion der sekundären Lamellen beobachtet werden. Die am häufigsten auftretende histopathologische Veränderung in der Restniere war ein verstärktes Auftreten von interstitiellen Hyalintröpfchen (in milder Ausprägung) in allen mit Diclofenac exponierten Gruppen (Tabelle 3). Interstitielle proteinöse Flüssigkeitseinlagerungen (milde bis moderate Ausprägung) und eine milde tubuläre Nekrose konnte regelmäßig in Fischen beobachtet werden, die den höheren Diclofenac-Konzentrationen ausgesetzt waren. Einige Fische zeigten darüber hinaus proteinöse Zylinder in den Tubuli, sowie intratubuläre und intravasculäre proteinöse Flüssigkeitsablagerungen. Histopathologische Veränderungen in der Leber Diclofenac-exponierter Forellen umfassten Monozyten-Infiltration /-Ansammlungen, am deutlichsten sichtbar in den mit 5 µg/L Diclofenac exponierten Fischen, sowie Erweiterung der Sinusoide, diffuses Zytoplasma und fokale Nekrose (Tabelle 4). Darüber hinaus wurden einzelne Fälle von interstitiellen proteinösen Flüssigkeitseinlagerungen, Stellen mit erhöhter Basophilie und schütteres Zytoplasma beobachtet.

Tabelle 2: Histopathologische Effekte von Diclofenac in Kiemen nach Exposition für 21 Tage.

Diclofenac [µg/L]	Telangiectasis	Hyperplasie	Verdickte Lamellenspitzen	Hyperplasie muköser Zellen	Fusion der sek. Lamellen	Keulenartige Verdickung der Lamellen
Kontrolle	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)
0.5	0 (1/6) 1 (2/6) 2 (1/6) 3 (2/6)	0 (5/6) 1 (1/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)
5	0 (2/4) 3 (2/4)	0 (2/4) 1 (2/4)	1 (1/4)	0 (5/6) 1 (1/6)	2 (1/4)	0 (4/4)
50	0 (2/6) 2 (3/6) 3 (1/6)	0 (4/6) 1 (2/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (4/6) 1 (1/6) 2 (1/6)	0 (2/6) 1 (3/6) 2 (1/6) **

Einstufung der histopathologischen Effekte: 0 = normal, 1 = mild, 2 = mild - moderat, 3 = moderat, 4 = schwerwiegend; in Klammern angegeben: Zahl der Forellen, die den genannten Effekt zeigen / Zahl der

Forellen, die einer histopathologischen Untersuchung unterzogen wurden. Die Daten wurden mit Kruskal-Wallis nicht-parametrischem ANOVA auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht, ** $p \leq 0.01$.

Tabelle 3: Effekte von Diclofenac in der Restniere nach Exposition für 21 Tage.

Diclofenac [$\mu\text{g/L}$]	Interstitielle Hyalintröpfchen	Interstitielle proteinöse Flüssigkeit	Tubuläre Nekrose	Proteinöse Zylinder	Intratubuläre proteinöse Flüssigkeit	Intravasculäre proteinöse Flüssigkeit
Kontrolle	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)
0.5	0 (1/6) 1 (5/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)
5	0 (4/6) 1 (2/6)	0 (3/6) 1 (3/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (5/6) 1 (1/6)	0 (6/6)
50	0 (3/6) 1 (1/6) 2 (2/6)	0 (1/6) 1 (2/6) 2 (2/6) 3 (1/6)	0 (3/6) 1 (1/6) 2 (2/6)	0 (5/6) 1 (1/6)	0 (5/6) 1 (1/6)	0 (5/6) 1 (1/6)

Einstufung der histopathologischen Effekte: 0 = normal, 1 = mild, 2 = mild - moderat, 3 = moderat, 4 = schwerwiegend; in Klammern angegeben: Zahl der Forellen, die den genannten Effekt zeigen / Zahl der Forellen, die einer histopathologischen Untersuchung unterzogen wurden. Die Daten wurden mit Kruskal-Wallis nicht-parametrischem ANOVA auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Tabelle 4: Effekte von Diclofenac in der Leber nach Exposition für 21 Tage.

Diclofenac [$\mu\text{g/L}$]	Monozyten Infiltration/Ansammlung	Sinusoid Distension	Diffuses Zytoplasma	Fokale Nekrose	Stellen erhöhter Basophilie	Interstitielle proteinöse Flüssigkeit	Schütteres Zytoplasma
Kontrolle	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)
0.5	0 (4/6) 1 (2/6)	0 (5/6) 2 (1/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (6/6)	0 (4/6) 1 (2/6)
5	0 (1/6) 1 (2/6) 2 (3/6)	0 (4/6) 1 (2/6)	0 (4/6) 1 (1/6) 2 (1/6)	0 (4/6) 1 (1/6) 2 (1/6)	0 (5/6) 1 (1/6)	0 (5/6) 1 (1/6)	0 (5/6) 1 (1/6)
50	0 (2/6) 1 (3/6) 2 (1/6)	0 (3/6) 1 (2/6) 2 (1/6)	0 (5/6) 2 (1/6)	0 (3/6) 1 (3/6)	0 (5/6) 1 (1/6)	0 (5/6) 1 (1/6)	0 (6/6)

Einstufung der histopathologischen Effekte: 0 = normal, 1 = mild, 2 = mild - moderat, 3 = moderat, 4 = schwerwiegend; in Klammern angegeben: Zahl der Forellen, die den genannten Effekt zeigen / Zahl der Forellen, die einer histopathologischen Untersuchung unterzogen wurden. Die Daten wurden mit Kruskal-Wallis nicht-parametrischem ANOVA auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht, ** $p \leq 0.01$.

3.5.5. Immunhistologischer Nachweis einzelner Leukozyten-Populationen in Organproben

Der immunhistologische Nachweis verschiedener Leukozyten-Populationen in der Restniere zeigte einen deutlichen Anstieg der Granulozytenzahlen im Interstitium zusammen mit einer erhöhten MHC II Expression in Diclofenac exponierten Forellen, was auf eine Entzündungsreaktion hindeutet (Abb. 7). Die beobachteten Effekte folgten allerdings keiner Dosis-Wirkungskurve. Während Exposition mit 0,5 und 5 µg/L Diclofenac zu einer Zunahme der MHC II Expression führte, resultierte Exposition mit 50 µg/L in einer Abnahme der MHC II Expression. In den Fischen, die den niedrigeren Konzentrationen ausgesetzt waren ging die Zunahme der MHC II Expression mit einem Verlust der morphologischen Integrität einher. Verteilung und Anzahl der Thrombozyten im Nierengewebe Diclofenac-exponierter Forellen waren unverändert im Vergleich mit den Kontrolltieren.

In den primären Kiemenlamellen von Bachforellen, die 0,5 µg/L Diclofenac ausgesetzt waren zeigte sich gegenüber den Kontrolltieren eine erhöhte Granulozytenanzahl (Abb. 8). Die Thrombozytenzahlen und Verteilung dieser Zellpopulation, sowie die MHC II-Expression in den Kiemen waren durch die Exposition mit Diclofenac nicht beeinflusst.

In allen anderen untersuchten Geweben, nämlich Kopfniere, Milz, Leber und Darm konnten keine deutlich erkennbaren Veränderung im Auftreten und der Verteilung von Thrombozyten, Granulozyten und der MHC II Expression gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden.

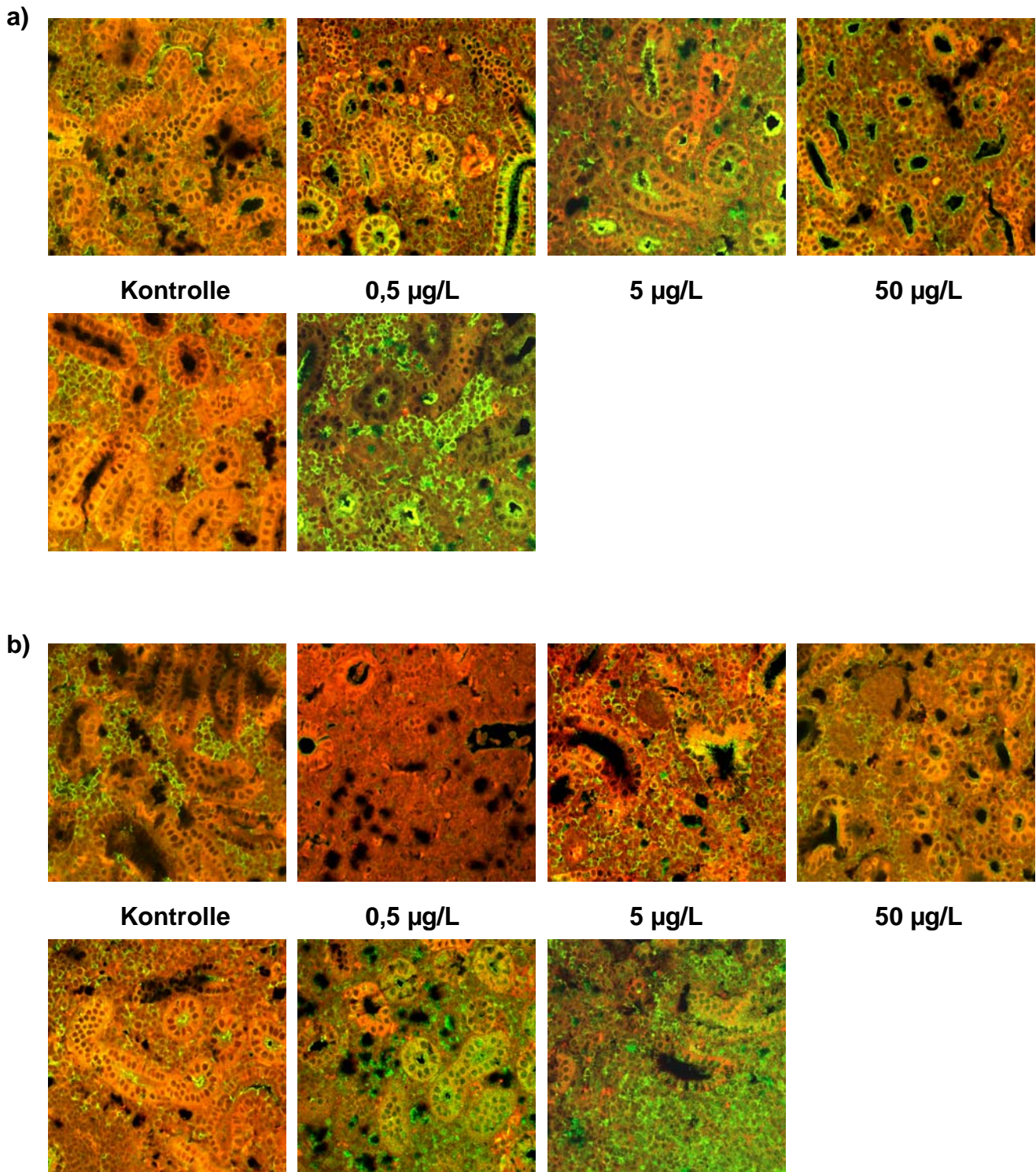


Abb. 7: Immunhistologischer Nachweis von Granulozyten (a) und Major Histokompatibilitäts Komplex (MHC) II (b) in Restnierenproben Diclofenac-exponierter Fische. In der ersten Reihe von a) and b) repräsentieren die gezeigten Bilder den Mittelwert der in den untersuchten Fischen beobachteten Reaktion. Zwei der vier untersuchten Forellen allerdings wiesen nach Exposition mit 0,5 µg/L Diclofenac eine starke Granulozytenansammlung in der Niere auf (a) (zweite Reihe). Exposition mit 0,5 and 5 µg/L Diclofenac führte darüber hinaus zu einem Verlust der morphologischen Integrität des Nierengewebes in zwei von vier Forellen je

Expositionskonzentration, zusammen mit einer starken Zunahme der MHC II Expression in einem dieser zwei Fische pro Konzentration. In allen fünf Fischen, die nach Exposition mit 50 µg/L untersucht wurden, war die MHC II Expression vermindert. Unterschiede in der grün / rot Intensität der Gewebe-Autofluoreszenz zwischen verschiedenen Proben, die in den Bilder zu sehen sind, beruhen auf Variationen in der Einstellung des Fluoreszenz-Scanners zwischen den unterschiedlichen Untersuchungstagen, an denen sämtliche Geräteeinstellungen mit Hilfe der entsprechenden Negativkontrolle abgeglichen wurden.

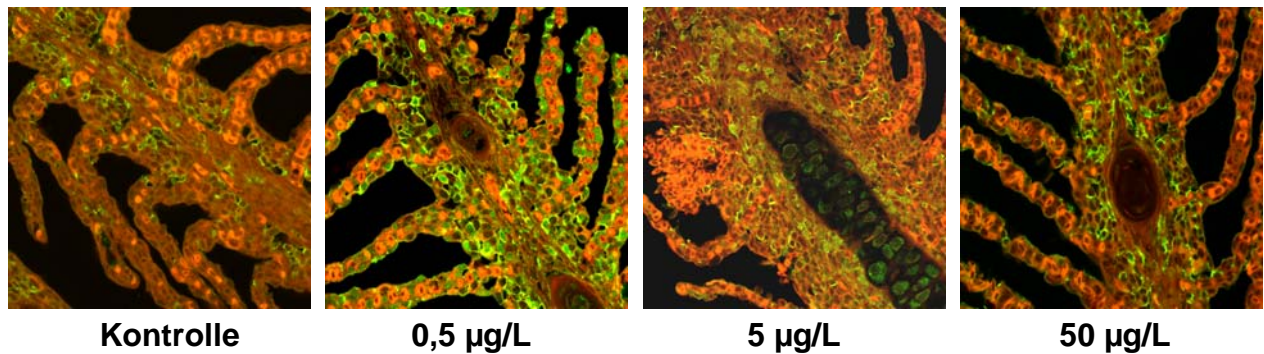


Abb. 8: Immunhistologischer Nachweis von Granulozyten in Kiemenproben. Exposition mit Diclofenac führte zu einer Zunahme der Granulozytenzahlen in den primären Kiemenlamellen, was am deutlichsten in Forellen der 0,5 µg/L Gruppe zu sehen war.

3.6. Cyclooxygenase-Inhibierung in Makrophagen

Die Stimulierung von Kopfnieren Makrophagen mit LPS und dem Calcium-Ionophor A 23187 führte zu einer deutlichen Induktion der Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Synthese. Die Induktion von PGE₂ konnte durch die Zugabe von 100 nM (31,8 ng/L) Diclofenac signifikant gehemmt werden (Abb. 9).

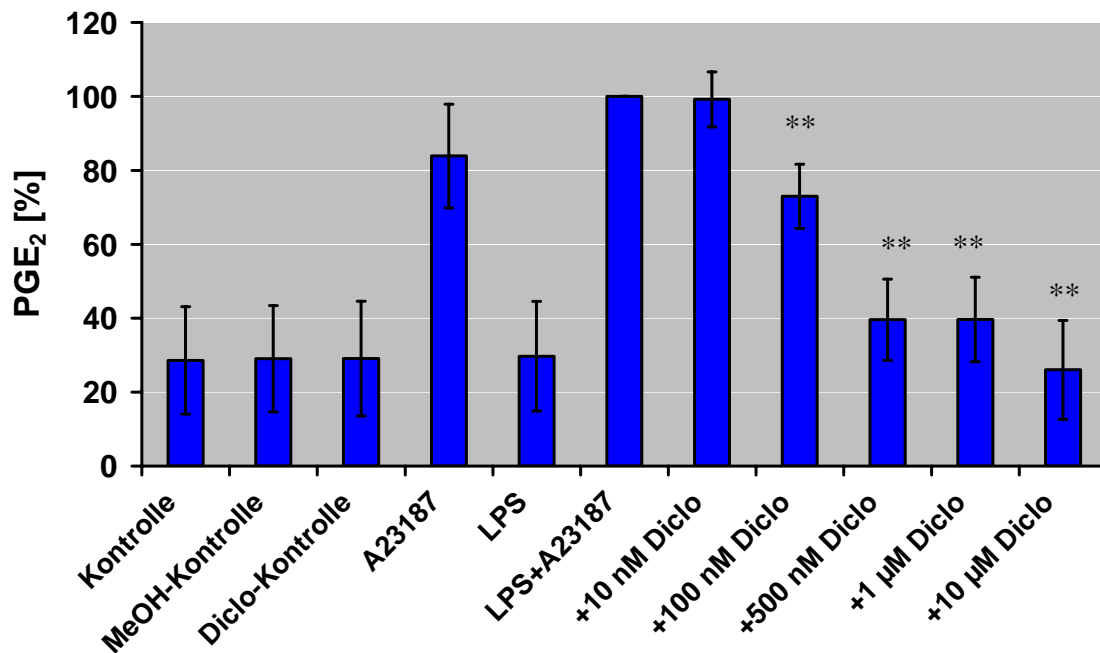


Abb. 9: Prostaglandin E₂ (PGE₂) in Zellkulturüberständen von Kopfnieren-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und dem Calcium-Ionophor A23187, sowie Hemmung der PGE₂-Synthese durch Diclofenac (Diclo). Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Daten wurden mit one-way ANOVA mit Dunnett's post test gegen LPS+A23187 (als 100% gesetzt) getestet, n=4, ** p<0,01.

Die PGE₂-Synthese nahm weiter ab bei Zugabe von 500 nM und 1 µM Diclofenac, allerdings konnte mit den verwendeten Testkonzentrationen keine klare Dosis-Wirkungskurve gezeigt werden. Bei einer Diclofenac-Konzentration von 10 µM war eine komplette Hemmung der PGE₂-Synthese und somit PGE₂-Level im Bereich unbehandelter und mit Methanol behandelte Zellen (Vehikel-Kontrolle) zu beobachten.

4. Diskussion

Die Ergebnisse des Expositionsversuchs zeigen, dass Diclofenac in umweltrelevanten Konzentrationen, im Serum und in Organen von Bachforellen nur in minimalen Konzentrationen nachweisbar ist. Dies deutet auf einen schnellen Metabolismus und eine hohe Eliminierungsrate dieses Wirkstoffs hin. Eine hohe Biokonzentration oder gar Akkumulation des Diclofenac ist nicht nachweisbar, wie es aufgrund der chemischen Struktur und Eigenschaften auch zu erwarten war. Wenn auch der Wirkstoff nur in minimalen Konzentrationen in den Fischmatrizes zu detektieren ist, konnte aufgrund des Wirkmechanismus aber nicht davon ausgegangen werden, dass eine Beeinflussung des Immunsystems der Bachforellen ausbleibt.

Aus diesem Grund und aufgrund der zu wenig sensitiven Analytik mittels GC-MS von Diclofenac aus Organen der Forellen nach Exposition über das Umgebungswasser, wurden Versuche mit ¹⁴C-Diclofenac sowie weitere Expositionsversuche mit Diclofenac durchgeführt.

In den Untersuchungen mit ¹⁴C-markiertem Diclofenac konnten wir erstmals zeigen, dass Diclofenac in Bachforellen einem enterohepatischen Zyklus unterliegt und damit länger im Organismus verbleiben kann.

Die toxikologischen Untersuchungen nach Exposition von Bachforellen mit Diclofenac im Umgebungswasser zeigten, dass Diclofenac bereits in der Größenordnung der Konzentrationen, die in Oberflächengewässern vorkommen, zu einer Verminderung der Hämatokrit-Werte, zu histopathologischen Veränderungen in Kieme, Restniere und Leber, sowie zu einer Zunahme der Granulozytenzahlen in Niere und Kieme und erhöhter MHC II-Expression in der Niere führt.

Unser Befund, dass Diclofenac in Bachforellen, analog zu Säugetieren einen enterohepatischen Zyklus durchläuft führt zu der Annahme, dass Diclofenac nicht vollständig ausgeschieden wird und im Organismus angereichert werden kann. Diese Annahme wurde auch indirekt durch die Untersuchungen von Schwaiger et al. (2004) bestätigt, die nach Exposition von Bachforellen für 28 Tage eine Anreicherung von Diclofenac in verschiedenen Geweben zeigen konnten. Unsere Annahme, dass Diclofenac in Form eines Glucuronid-Konjugates in die Galle gelangt, konnte mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie unterstützt aber nicht zweifelsfrei bewiesen werden. In Säugetieren wurde bislang eine Glucuronidierung von Diclofenac beschrieben, die

allerdings instabil ist und in einer weiteren Reaktion durch Glutathion ersetzt werden kann (Kretz-Rommel & Boelsterli, 1994; Grillo et al., 2003). Eine Glucuronidierung von Diclofenac liegt vermutlich auch dem Auftreten eines enterohepatischen Zyklus zugrunde, da im Darm vor allem Glucuronid-Konjugate durch bakterielle β -Glucuronidasen wieder gespalten werden können, was zu einer Freisetzung des Diclofenac und letztendlich erneuerten Aufnahme in den Blutkreislauf, Metabolisierung in der Leber und Abgabe in die Galle führt.

In unserer Durchfluss-Expositions-Studie zeigten sich Auswirkungen von Diclofenac in einer Abnahme der Hämatokrit-Werte in exponierten Bachforellen bereits nach einer Expositionsdauer von 7 Tagen. Eine Verminderung der Hämatokrit-Werte nach Einnahme von Diclofenac ist bereits in Patienten beobachtet worden und konnte auch in Ratten-Studien gezeigt werden (Elliott et al., 1995; Sanchez et al., 2002). Da für Prostaglandine unter anderem eine regulierende Rolle in der Blutbildung beschrieben ist, können die verminderten Hämatokrit-Werte eventuell auf eine verminderte Blutbildung zurückgeführt werden. Die vorliegenden Studien lassen keine Schlüsse auf Konsequenzen der niedrigeren Hämatokrit-Werte zu. Denkbar ist allerdings, dass eine geringere Anzahl von roten Blutkörperchen gemäß Hämatokrit, den Sauerstofftransport im Organismus beeinträchtigt. Für die Leukokrit-Werte zeigte sich kein dosisabhängiger bzw. über die Zeit einheitlich verlaufender Effekt der Diclofenac-Exposition. Bei der, laut Statistik signifikanten Verminderung der Leukokrit-Werte nach Exposition mit 0,5 $\mu\text{g/L}$ Diclofenac für 14 Tage handelt es sich vermutlich um einen Fehler 1. Art in der statistischen Auswertung. Eine sinnvolle Aussage über Auswirkungen von Diclofenac auf die Leukokrit-Werte exponierter Fische lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht ableiten.

In Bachforellen, die 5 $\mu\text{g/L}$ Diclofenac ausgesetzt waren, konnte eine über die Zeit zunehmende Stimulierung der Serum Lysozym Aktivität beobachtet werden. Aussagen über den Mechanismus, der dem beobachteten Effekt zugrunde liegt können bislang nicht gemacht werden. Auch sind die Konsequenzen einer Stimulierung dieser Immunreaktion in Fischen durch anthropogene Substanzen in Gewässern schwer abschätzbar.

Untersuchungen von Organproben zeigten histopathologische Veränderungen in Niere, Kieme und Leber Diclofenac-exponierter Bachforellen. Adverse Effekte von Diclofenac in der Niere wurden bereits in verschiedenen Spezies, wie z.B. in Ratten und Geier, sowie in Menschen beschrieben (Hickey et al., 2001; Oaks et al., 2004). Erste Hinweise auf negative Auswirkungen

von Diclofenac auf Fische wurden bereits von Schwaiger et al. (2004) erbracht, die das Auftreten von Hyalintröpfchen, eine Degeneration von Tubuluszellen und eine interstitielle Nephritis in Niereproben von Regenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die über 28 Tage einer Konzentration von 5 µg/L ausgesetzt waren, beschreiben. Es wird angenommen, dass die Nephrotoxizität von Diclofenac hauptsächlich auf die Inhibierung der Prostaglandin-Synthese und darausfolgende Veränderungen in Prostaglandin-regulierten Mechanismen, wie z.B. Gefäßtonus, Gefäßpermeabilität und Ionenhaushalt zurückzuführen ist (Sanchez et al., 2002). *In vitro* Untersuchungen zur Prostaglandin E₂-Synthese in Kopfnieren-Makrophagen zeigten, dass Diclofenac analog zu seiner Wirkweise in Säugetieren auch in Forellen die Stimulierung der Cyclooxygenase-Aktivität hemmen kann. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Diclofenac in Fischen den gleichen Wirkmechanismus wie bereits in Säugetieren beschrieben verfolgt und somit ähnliche Auswirkungen haben kann.

Es ist bekannt, dass die Effekte von NSAIDs auf die Prostaglandin Synthese in Menschen zu Natriummangel und Hyperkalämie führen können. Hickey et al. (2001) nehmen darüber hinaus an, dass oxidative Schäden und darausfolgende Nekrosen und möglicherweise auch apoptotischer Zelltod eine wichtige Rolle bei der durch Diclofenac induzierten Nephrotoxizität spielen. In der vorliegenden Studie zeigten immunhistologische Untersuchungen das Vorhandensein einer entzündlichen Reaktion in Nierenproben Diclofenac-exponierter Bachforellen, die durch eine Zunahme der Granulozytenzahlen und einer erhöhten MHC II Expression charakterisiert war. Diese Erkenntnis unterstützt die These, dass den beobachteten Nierenschädigungen ein entzündlicher Prozess zugrunde liegt. Unsere Ergebnisse können allerdings keinen Aufschluss über den Auslöser der Entzündungsreaktion geben, bei dem es sich sowohl um Proteinaddukte, wie bereits in Säugetieren beschrieben (Atchison et al., 2000; Hargus et al., 1995), als auch um oxidativen Stress handeln könnte.

Die histopathologischen Veränderungen in der Leber Diclofenac-exponierter Bachforellen, wie z.B. die Infiltration von Monozyten, könnten ebenfalls auf eine entzündliche Reaktion hindeuten. Allerdings konnten in Leberproben keine deutlichen Veränderungen in Leukozytenzahlen oder MHC II Expression, die einen Entzündungsprozess charakterisieren könnten, beobachtet werden. Wie bereits für die Niere angemerkt, können außerdem keine Aussagen über die Auslöser und Wirkmechanismen, die den beobachteten Effekten in der Leber zugrunde liegen, getroffen werden.

Die erhöhte Inzidenz von Telangiectasis in Kiemenproben Diclofenac-exponierter Bachforellen, die in der vorliegenden Studie beobachtet wurde, steht in Einklang mit den Ergebnissen von Schwaiger et al. (2004) für Regenbogenforellen (*O. mykiss*) nach Exposition mit Diclofenac Konzentrationen im niedrigen $\mu\text{g/L}$ Bereich. Für Telangiectasis sind eine Reihe möglicher Auslöser bekannt, wie z.B. Parasitenbefall, unzulängliche Probennahme Techniken und sublethale Ammonium Intoxikation (Bullock et al., 1994; Goodwin, 1999; Herman & Meade, 1985; Powell et al., 2004; Redner & Stickney, 1979). In der vorliegenden Studie konnte der Auslöser und zugrunde liegende Mechanismus, der zu der starken Ausprägung von Telangiectasis in Diclofenac-exponierten Fischen führte nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Allerdings deutet die hohe Inzidenz von Telangiectasis nach Diclofenac-Exposition gegenüber einem vernachlässigbarem Hintergrundlevel in Kontrollfischen auf eine wesentliche Rolle von Diclofenac bei der Manifestation der Telangiectasis in exponierten Fischen hin. Zusätzlich zu den histopathologischen Veränderungen in den Kiemen, weisen immunhistologische Untersuchungen auf eine Zunahme der Granulozytenzahlen in primären Kiemenfilamenten hin, die sich am deutlichsten in den Fischen der $0,5 \mu\text{g/L}$ Diclofenac-Gruppe zeigte. Diese Granulozyten-Infiltration könnte auf das Vorhandensein einer entzündlichen Reaktion hindeuten, die mit einer Schädigung des Gefäßendothels einhergeht. Adverse Effekte von Diclofenac auf die Kiemen hängen vermutlich mit der Rolle der Prostaglandine in der Regulation des Ionentransportes zusammen. In Säugetieren sind Prostaglandine als wesentliche Regulatoren des Blutkreislaufes und der Ionenkonzentration in der Niere bekannt. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass in Fischen Prostaglandine eben diese Regulationsmechanismen auch in den Kiemen beeinflussen, wo Blutzirkulation und Ionenregulation essentielle biologische Mechanismen darstellen. Folglich könnten Bachforellen, die chronisch niedrigen Diclofenac-Konzentrationen ausgesetzt sind, Schädigungen zeigen, die mit der Inhibierung der COX und folglich PGE_2 -Synthese in Verbindung stehen.

Die Tatsache, dass Diclofenac über Kläranlagenabwasser kontinuierlich in Oberflächengewässer eingetragen wird, führt zu einer chronischen Exposition aquatischer Lebewesen. Zusammen mit Untersuchungen von Schwaiger et al. deuten unsere Studien darauf hin, dass Diclofenac schon in den in der aquatischen Umwelt vorhandenen Konzentrationen Auswirkungen auf verschiedene Organsysteme in Salmoniden haben kann. Auch wenn die letztendlichen Konsequenzen der gefundenen Effekte bislang nicht bekannt sind, ist eine Veränderung physiologischer Bedingungen, wie z.B. der Hämatokrit-Werte in Nicht-Zielorganismen generell bedenklich. Bei

der Aktivierung von Reaktionen, wie z.B. nicht ziel-gerichtete Aktivierung einer Immunreaktion, kann grundsätzlich ein erhöhter Energiebedarf angenommen werden. Entsprechend können Abweichungen von der Homöostase generell zu einer erhöhten Stressanfälligkeit führen und somit die Gesundheit betroffener Tiere gefährden.

Die Erkenntnis, dass schon die niedrigen, in der Umwelt teilweise auftretenden Diclofenac Konzentrationen schädlich für aquatische Organismen sein können, steht im Widerspruch zu den auf akuten Tests beruhenden Risikoabschätzungen. Berechnungen von ‚predicted environmental concentration (PEC)‘ / ‚predicted no observed effect concentration‘ (PNEC) Quotienten unter Verwendung von Ergebnissen aus Akut- und subchronischen Toxizitätstests, deuten auf kein erhöhtes Risiko für die aquatische Umwelt hin, da PEC/PNEC Quotienten den Wert 1 nicht überschreiten (Ferrari et al., 2004). In der vorliegenden Studie wurde basierend auf der aktuellen “Draft Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products” (EMA, 2005) ein PEC von 0,5 µg/L ermittelt, wobei eine maximale therapeutische Dosis von 100 mg Diclofenac pro Tag angenommen wurde. Die ‚no observed effect concentration‘ (NOEC) liegt für die Monozyten-Infiltration / Anreicherung in der Leber von Bachforellen nach Exposition für 21 Tage bei 0,5 µg/L Diclofenac, obwohl in dieser Expositionsgruppe bereits in 2 von 6 Forellen leichte Effekte gesehen wurden. Für die Berechnung des PNEC wird in der Regel ein Sicherheitsfaktor (assessment factor, AF) von jeweils 10 für intra- und interspezies Unterschiede sowie für die Extrapolation von Labordaten auf die tatsächliche Umweltsituation miteingerechnet. Da die vorliegende Studie nicht als akut sondern eher als subchronisch eingestuft werden kann, wurde hier allerdings ein AF von 100 gewählt, woraus sich ein PNEC von 0,005 µg/L ergibt. Für den PEC/PNEC Quotienten ergibt sich folglich ein Wert von 100, was auf die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen hinweist und eine detailliertere Risikoabschätzung für diese Substanz nahe legt.

5. Literatur

- Deng, A., Himmelsbach, M., Zhu, Q. Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niessner, R. & Knopp, D. 2003. Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. *Environ Sci Technol*, **37**, 3422-3429.
- Elliott, S. N., McKnight, W., Cirino, G. & Wallace, J. L. 1995. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterol*, **109**, 524-530.
- EMA. 2005. Committee for medicinal products for human use (CHMP) - Draft guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. London: European Medicines Agency.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. & Garric, J. 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ Toxicol Chem*, **23**, 1344-1354.
- Grillo, M. P., Knutson, C. G., Sanders, P. E., Waldon, D. J., Hua, F. & Ware, J. A. 2003. Studies on the chemical reactivity of diclofenac acyl glucuronide with glutathione: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in rat bile. *Drug Metab Dispos*, **31**, 1327-1336.
- Grosser, T., Yusuff, S., Cheskis, E., Pack, M. A. & FitzGerald, G. A. 2002. Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. *PNAS USA*, **99**, 8418-8423.
- Itazawa, Y., Takeda, T., Yamamoto, K. & Azuma, T. 1983. Determination of circulating blood volume in three teleosts, carp, yellowtail and porgy. *Jap J Ichthyol*, **30**, 94-107.
- Jones, O., Voulvoulis, N., Lester, J. 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res*, **36**, 5013-5022.
- Köllner, B., Fischer, U., Rombout, J. H. W. M., Taverne-Thiele, J. J. & Hansen, J. D. 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: A study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Dev Comp Immunol*. **28**, 1049-1062.
- Kretz-Rommel, A. & Boelsterli, U. A. 1994. Mechanism of covalent adduct formation of diclofenac to rat hepatic microsomal proteins. Retention of the glucuronic acid moiety in the adduct. *Drug Metab Disp*, **22**, 956-961.
- Kümmerer, K. (ed.) Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fates, Effects and Risks. 2nd edition, 2004, Springer-Verlag.

- Kuroda, A., Okamoto, N. & Fukuda, H. 2000. Characterization of monoclonal antibodies against antigens shared with neutrophils and macrophages in neutrophils in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol*, **35**, 205-213.
- Lehmann, M. 2000. Arzneimittel und hormonell wirksame Stoffe in Fließgewässern Baden-Württembergs. In: *25 Jahre LFU. Jahresbericht 1998/99*: LFU Baden-Württemberg.
- Sanchez, S., Alarcon de la Lastra, C., Ortiz, P., Motilva, V. & Martin, M. J. 2002. Gastrointestinal tolerability of metamizol, acetaminophen, and diclofenac in subchronic treatment in rats. *Dig Dis Sci*, **47**, 2791-2798.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. & Negele, R. D. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac; Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol*, **68**, 141-150.
- Secombes, C. J. 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: *Techniques in Fish Immunology* (Ed. by Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S. & Van Muiswinkel, W. B.), pp. 101-103. Fair Haven: SOS Publications.
- Stachowski, A., Hordvik, I., Koppang, E. & Köllner, B. 2004. Characterization of anti-salmonid MHC class II monoclonal antibodies (abstract, Joint Annual Meeting of the German and Dutch Society for Immunology, Maastricht, Oct. 20-23, 2004). *Immunobiology*, **209**, 481.
- Ternes, T. A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res*, **32**, 3245-3260.
- Ternes, T. A., Joss, A. & Siegrist, H. 2004. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *ES&T*, **38**, 393A-399A.
- Tort, L., González-Arch, F., Torres, P. & Hidalgo, J. 1991. On the blood volume of the mediterranean dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Fish Physiol Biochem*, **9**, 173-177.
- Zou, J., Hong, S., Holland, J., Stewart, I. & Secombes, C. J. 2000. Differential modulation of cyclooxygenases 1 and 2 in rainbow trout. *Dev Comp Immunol*, **24**, S60.

6. Kongressbeiträge und Publikationen

- Linke A., S. Schullerer, D.R. Dietrich and B. Hitzfeld: Uptake, distribution and bioconcentration of diclofenac in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). Poster, SETAC Europe 13th Annual Meeting, Hamburg 2003.
- Höger B., D. Schmid, D.R. Dietrich and B. Hitzfeld: Kinetics of Intraperitoneally Injected Diclofenac in Brown Trout (*Salmo trutta f. fario*). Poster, SETAC Europe 15th Annual Meeting, Lille 2005.
- Höger B., B. Köllner, D.R. Dietrich and B. Hitzfeld: Effects of Diclofenac-Exposure on Immune Parameters in Brown Trout (*Salmo trutta f. fario*). Vortrag, Special Symposium: Ecotoxicology of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment; SETAC Europe 15th Annual Meeting, Lille 2005.
- Hoeger B., B. Köllner, D:R. Dietrich, and B. Hitzfeld: Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). Aquatic Toxicology, submitted (status: acceptable with minor revisions)
- Hoeger B., D. Schmid, M. Arsic, D.R. Dietrich and B. Hitzfeld: Distribution of intraperitoneally injected diclofenac in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). Manuscript in preparation.