Bundeswehrkrankenhaus Ulm
Akademisches Krankenhaus der Universität Ulm

Klinik und Poliklinik
Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
Kopf- und Halschirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H. Maier, OTA

Experimentelle Untersuchungen zu Genotoxizität von Insektiziden und Repellentien sowie den Kombinationen DEET-Pyridostigminbromid, DEET-Permethrin, Permethrin-Pyridostigminbromid und DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin an humanen Lymphozyten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Dr. med.,
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Cornelia Charlotte Helene Beck
aus München

2009

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter

Prof. Dr. H. Maier

2. Berichterstatter

Prof. Dr. A. Schramm

Tag der Promotion:

12.02.2010

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	4
1	Einleitung	7
2	Material und Methoden	14
2.1	Lymphozytenseparation	14
2.2	Materialien und Reagenzien	14
2.3	Lösungen	20
2.4	Versuchsaufbau	22
2.5	Statistik	35
3	Ergebnisse	35
3.1	Versuchsablauf bis zur Mikrogelelektrophorese	36
3.2	Ergebnisse der Versuchsreihen	37
3.2.1	Triazapentadien: Amitraz	38
3.2.2	Pyrethroide	40
3.2.3	Thiophosphonate	50
3.2.4	Glykolether	52
3.2.5	Naturstoffe	54
3.2.6	Cholinesterasehemmstoffe	56
3.2.7	Acetylcholinesterasehemmstoffe und Carbamate	58
3.2.8	Hemmung des GABA kontrollierten Chloridkanals	60
3.2.9	Silane	62
3.2.10	Akarizide	64
3.2.11	Insekten Repellentien	66
3.2.12	Substanzkombinationen	72
4	Diskussion	80
4.1	Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)	80
4.1.1	Mögliche Fehlerquellen in der Versuchsdurchführung	84
4.2	Substanzgruppen/Substanzen	93
4.2.1	Exposition humaner Lymphozyten mit Amitraz (Gruppe Triazapentadien)	93
4.2.2	Pyrethroide	94
4.2.2.1	Naturpyrethrum (Gruppe der Pyrethrine)	94
4.2.2.2	Synthetische Pyrethroide	95
4.2.3	Thiophosphonate	103
4.2.4	Glykolether	105
4.2.5	Cholinesterasehemmstoffe	106
4.2.6	Acetylcholinesterasehemmstoffe und Carbamate	113

4.2.7	Hemmung des GABA regulierenden Chloridkanals	113
4.2.8	Silane	114
4.2.9	Akarizide: Pyrazoloximether: Fenpyroximat	114
4.2.10	Insekten Repellentien: Ester, Amide	115
4.2.11	Substanzkombinationen	117
4.2.12	Vergleich der Genotoxizität aller getesteten Substanzen	126
5	Zusammenfassung	127
6	Literatur	129
	Danksagung	151
	Lebenslauf	152

Abkürzungen

Abb	Abbildung
Aqua dd	doppelt destilliertes Wasser
AV-Block	Atrioventrikulärer Block
BSI	British Standard Institution
CA	Cancer Antigen
$C_4H_{11}NO_3$	Trispuffer
$C_{15}H_{28}NO_3Na$	N-Lauroyl-Sarcosinat
°C	Grad Celsius
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO/HGPRT-Test	Test der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase; Enzym für normalen Purinstoffwechsel an Chinese Hamster Ovary cells (Genmutationstest)
DDT	Dichlordiphenyltrichloräthan, Dichlordiphenyltrichlormethylmethan
DEET	Diethylmethylbenzamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonucleinacid (= englische Bezeichnung für DNS)
DNS	Desoxiribonukleinsäure; Träger der genetischen Information in den Chromosomen des Zellkerns
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EW	Einwaage
FCS	fötales Kälber Serum (Nährmedium)
GABA	Gamma Amino Buttersäure
HCl	Salzsäure

IARC	International Agency for Research of Cancer
ISO	International Organisation for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KG	Körpergewicht in Kilogramm
KCl	Kaliumchlorid
LD_{50}	mittlere letale Dosis
LK	Leerkontrolle, Lösungsmittelkontrolle
MCS	multiple chemicale Sensitivität
MG	Molares Gewicht = molare Masse
mM	mmol/ml
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid; Kochsalz
Na_2EDTA	Titriplex
NH_4	Ammoniak
NaOH	Natronlauge
OTM	Olive Tail moment absolut ohne physikalische Einheit, % DNA im Cometenschweif x Abstand zwischen Kopf- und Schweifzentrum; Zusätzlich zu den Längenmaßen werden hierbei auch Leuchtintensitäten an Kopf und Schwanz berücksichtigt.
OTM<2	ein aus allen Zellen der Spalte OTM ausgezählter Wert. OTM = 2 stellte den Grenzwert zwischen deutlich geschädigten und ungeschädigten Zellen dar, OTM<2 entspricht dem Anteil an nicht bzw. gering geschädigten Zellen. OTM>2 repräsentiert die deutlich geschädigten Zellen des Kollektivs.
Pa	Pascal = $m^{-1} * kg * s^{-2}$ (=$N * m^{-2}$); Einheit des Drucks

PBS	Phosphat buffered saline, gepufferte Salzlösung
PCP	Pentachlorphenol
pH	pondus hydrogenii (Maß für die Wasserstoffionenkonzentration in einer Lösung, gibt an, ob eine Lösung sauer oder basisch ist)
p.o.	per oral
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium, Nährmedium für Zellen
TE	Tail extent in Mikrometer, entspricht der Schweiflänge
T+	sehr giftig (Gefahreneigenschaft nach der Gefahrstoffverordnung)
ULV-Lösung	Ultra Low Volume Liquid
UV-Licht	ultraviolettes Licht
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsbehörde
Xn	mindergiftig (gesundheitsschädlich); Gefahreneigenschaft nach Gefahrstoffverordnung
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfung sind seit Beginn der Zivilisation wesentlicher Bestandteil im Leben der Menschen. Ob in der Landwirtschaft, im Vorratsschutz oder der Haushaltshygiene stellt der Umgang mit Insektiziden und Pestiziden für den Menschen eine Belastung dar, der er, meist unbewusst, täglich ausgesetzt ist. Trotz Entwicklung weniger toxischer Mittel und ausführlicher Hinweise zum Umgang mit den jeweiligen Substanzen bleibt immer ein Restrisiko für die Gesundheit des Anwenders bestehen.

Die historische Entwicklung des Pflanzenschutzes während der verschiedenen Epochen muss immer in Abhängigkeit von der jeweiligen sozialen Struktur und der damit verbundenen Produktionsweise gesehen werden. Den ausgebauten und effizienten Pflanzenschutzmaßnahmen und -organisationen mit wissenschaftlicher Ausbildung und moderner technischer Ausrüstung in den Industrieländern stehen z.T. noch relativ einfache Bekämpfungsmethoden in den Entwicklungsländern gegenüber.

Die Bekämpfung von Schaderregern ergab sich ursprünglich aus der Notwendigkeit, pflanzliche Vorräte vor ihrem Befall zu sichern. Die Schädlingsbekämpfung reicht somit bis in die Frühzeit der Menschheitsgeschichte zurück, als man mit der vorsorglichen Speicherung von Vorräten begann. Später, mit dem Übergang von der extraktiven Produktionsweise (Sammler und Jäger) zur intensiven Feldbewirtschaftung, mit Beginn des Ackerbaues und der damit verbundenen Kultivierung für die Ernährung geeigneter Pflanzen, musste man auch entsprechende Maßnahmen zum Schutze dieser Kulturen vor Schädlingsbefall entwickeln.

So kann man die ersten Anfänge eines „Pflanzenschutzes“ mit dem Beginn des Ackerbaues, wie er seit mehr als 4000 Jahren v. Chr. aus den fruchtbaren

Ebenen des Indus, Mesopotamiens, Ägyptens, Palästinas, Chinas u. a. bekannt ist, gleichsetzen. Während über tierische Pflanzenschädlinge schon frühzeitig berichtet worden ist, finden sich Hinweise auf Pflanzenkrankheiten mit wenigen Ausnahmen erst in viel späteren Jahrhunderten. Zeugnis davon geben aus dieser frühen Zeit Aufzeichnungen, Inschriften und Abbildungen von Heuschrecken, Raupen, Käfern, Fliegen, madigen Früchten, Galläpfeln, Würmern, Nagetieren sowie zu den schon in der Bibel erwähnten pilzlichen Erkrankungen wie Rost, Brand oder Mehltau, aber auch über Unkräuter.

Der Anbau von einzelnen Pflanzenarten in geschlossenen Beständen, wie Felder oder Plantagen, wirkte sich auf das biologische Gleichgewicht in der Natur aus. Unter ursprünglichen Verhältnissen ist das Wechselspiel der natürlichen Lebensgemeinschaften, zwar labil, ändert sich jedoch nicht wesentlich zugunsten einer Organismenart. Anders dagegen führt der Anbau von einzelnen Pflanzenarten in „einheitlichen Beständen“ zu Monokulturen. Beispiele dafür gibt es in vielen Ländern, wie der Zuckerrohranbau, der Maisanbau, der Baumwollanbau, Kaffeeanbau u. a., die zur „Monokulturwirtschaft“ geführt haben. Neben den wirtschaftlichen Risiken, die eine so einseitig ausgerichtete Wirtschaftsweise mit sich bringt, stellt eine solche Monokulturlandschaft den Pflanzenanbau und damit die Schädlingsbekämpfung vor eine extrem schwierige Aufgabe. [84]

In der Landwirtschaft ermöglicht der bewusste Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln größere Erträge beim Anbau von Getreide und Gemüse und in der Lagerhaltung von Lebensmitteln die erfolgreiche Bekämpfung z.B. von Schadnagern.
Der Wohlstand der westlichen Welt ist zu einem nicht unerheblichen Anteil dem gezielten Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln zu verdanken.

Dies wird im Zeitalter von Biolandwirtschaft und -ökologie oft vergessen. Vielmehr stellt man sich die Frage, ob ein Einsatz von Insektiziden und Pestiziden überhaupt noch notwendig ist.

Auf chemische Schädlingsbekämpfung kann heutzutage jedoch kaum noch verzichtet werden. Die Zunahme der Weltbevölkerung mit der Angst einer Gefährdung der Ernte und Resistenzenbildung gegen gängige Schädlingsbekämpfungsmittel machen immer spezifischere Entwicklungen auf diesem Gebiet notwendig.
Untersuchungen ergaben, daß der durch Schaderreger verursachte Schaden 54% der tatsächlichen und rund 35% der potentiellen Ernte beträgt. [31]

Nach neueren Angaben betrugen die Ernteverluste bei 8 wichtigen Kulturen (Reis, Weizen, Gerste, Mais, Kartoffel, Sojabohne, Baumwolle und Kaffee) durch Schädlinge im Zeitraum von 1988-1990 weltweit rund 42,1% der erreichbaren Ernte, was einem Gesamtwert von 243,7 Milliarden US$ entspricht. [15]

Durch den unkontrollierten Einsatz von Insektiziden und Pestiziden werden jedoch die ökologischen Nischen für Nützlinge immer weniger, Resistenzen in der Bekämpfung von Schädlingen werden gefördert und der Gehalt an Schadstoffen in der Nahrungskette steigt.

Insektizide und Pestizide sind aber nicht nur in der Landwirtschaft von entscheidender Bedeutung. Sie spielen auch bei Vorbeugung bzw. Eindämmung von Seuchen und Krankheiten eine entscheidende Rolle.

Schädlinge sind häufig Vektoren für Krankheitserreger wie zum Beispiel Rickettsia prowazekii als Erreger des epidemischen Fleckfiebers (Vektor

Kleiderlaus), Yersinia pestis als Erreger der Pest (Vektor Rattenfloh), Plasmodien als Erreger der Malaria (Vektor Anopheles Mücke), Flaviviren als Erreger der FSME (Frühsommermeningoenzephalitis) und Borrelien als Erreger der Lyme Borreliose (in beiden Fällen Vektor Zecke (Ixodes ricinus)).
Durch das Auftragen von Insektenrepellentien auf die Haut kann das Risiko eines Stichs oder Bißes reduziert und damit die Gefahr der Erkrankung eingedämmt werden. Richtig angewandt bieten Repellentien einen sechs- bis achtstündigen Schutz. Dies ergaben Studien am Tropeninstitut in Basel. [148]

Insektizide und Pestizide ermöglichen einen hohen Lebensstandard und oftmals wurden erst durch ihren gezielten Einsatz Schaffung von Wohnraum in manchen Gegenden wie z.B. Malariagebieten durch Ausrottung der Vektoren möglich. Eine potentielle Gesundheitsgefährdung kann dabei nicht ausgeschlossen werden, was eine genaue Nutzen-Schadensabwägung notwendig macht. Schädlingsbekämpfung erfolgt und erfolgte jedoch nicht nur in der Landwirtschaft und zur Vektorenbekämpfung bei der Eindämmung von Krankheiten. Auch in Innenräumen kommen Insektizide als Material- bzw. Bautenschutz zum Einsatz.

Durch fundierte Forschung konnten schnell hochwirksame Substanzen gefunden und zum Einsatz gebracht werden. Erst im zeitlichen Verlauf zeigte sich auch ein gesundheitsschädigendes Potential wie bei Lindan® und PCP (Pentachlorphenol).

PCP führt zu Chromosomenveränderungen an Lymphozyten [8], im Tierversuch zeigte sich zusätzlich eine karzinogene Wirkung, entsprechend wurde die Substanz 1991 durch die IARC auch als mögliches Humankarzinogen in die Gruppe 2B, d.h. als möglicherweise krebserregend, eingestuft.

Für Lindan® wird eine mutagene Wirkung beschrieben, im Tierversuch konnte Genotoxizität [13] nachgewiesen werden, die sich auch in Versuchen mit menschlichen Nasenschleimhautepithelien bestätigte. [142]
An Leberzellen der Ratte konnte außerdem die Induktion von Lebertumoren nachgewiesen werden. [106]

Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurden beide Substanzen vom Markt genommen, was in der Konsequenz die Suche nach neuen Substanzen mit ähnlich gutem Wirkspektrum und möglichst geringem Nebenwirkungsprofil erforderlich machte.

Es kam zur Entwicklung von synthetischen Pyrethroiden, mit ihrem Hauptvertreter Permethrin, aber auch Insektiziden, wie DEET (Dieethylmethylbenzamid), die über ein gutes Wirkspektrum mit geringerem Nebenwirkungsprofil verfügten.
Der Einsatz von diesen neuen Insektiziden beschränkte sich jedoch nicht nur auf den zivilen Bereich und die Landwirtschaft. Auch das Militär bediente sich ihrer Vorteile.

In militärischen Konflikten spielt immer auch die Erhaltung der Gesundheit der Soldaten eine entscheidende Rolle. Hier ist die Bekämpfung von Schädlingen entscheidend, da diese nicht nur die Nahrungsmittelressourcen gefährden, sondern auch Vektoren für Krankheiten darstellen können und damit die Einsatzfähigkeit der Soldaten herabsetzen.

Nach Erkenntnissen Fauldes et al. sind von den 83 als militärisch relevant eingestuften, also die Kampfkraft und die Einsatzfähigkeit direkt gefährdenden Erkrankungen, 53 (etwa 2/3) vektor-assoziiert. Dabei kann die Vektordichte so

hoch sein, daß bis zu 280 Mückenstiche pro Minute pro Mensch dokumentiert wurden. [40]

Während des Golfkriegs wurden Uniformen und Haut der Soldaten mit Insektiziden wie DEET und Permethrin behandelt, um einen Vektorbefall und so eine Gesundheitsgefährdung der Einsatzkräfte zu verhindern.
Gleichzeitig wurde Pyridostigminbromid als Prophylaxe gegen Nerven-kampfstoffe eingesetzt.

Die multifaktorielle Einwirkung verschiedener Insektizide, hier hauptsächlich DEET und Permethrin als Repellentien und Vektorenschutz in Uniformen, und des Parasympatholytikums Pyridostigminbromid, als Prophylaxe gegen Nervenkampfstoffe, führte dabei zu einer Potenzierung der Wirkungen aber auch der Nebenwirkungen der Einzelsubstanzen. Dies führte nach Erkenntnissen von Abou-Donia et al. sowie Haley et al. zu nachweisbaren Schädigungen der Nervenzellen der Betroffenen mit entsprechenden Symptomen. [1, 49, 50] Eine eindeutige Kausalität konnte jedoch nicht bewiesen werden.

Der Symptomenkomplex wurde als Golfkriegssyndrom bezeichnet und stellt ein komplexes neurologisches Erkrankungsbild dar, dessen Langzeitfolgen für die Betroffenen noch nicht absehbar sind.

<u>Fragestellung:</u>
In der vorliegenden Arbeit wurde das genotoxisches Potential bei 17 Einzelsubstanzen (Amitraz, Bioresmethrin, Cyfluthrin, Phenothrin, Permethrin, Transfluthrin, Diazinon, Piperonylbutoxid Naturpyrethrum, Malathion, Pyridostigminbromid, Fipronil, Silafluophen, Fenpyroximate, DEET, 3535, Dimethylphthalat) und 4 Kombinationen aus der Gruppe der Insektizide und Repellentien an humanen Lymphozyten untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob diese Substanzen bei Lymphozyten in äquivalenten Konzentrationen eine genotoxische Reaktion hervorrufen können und welche Dosis-Wirkungsbeziehung sich dabei ergab. Außerdem sollte das genotoxische Potential der Kombinationssubstanzen untersucht werden.

1.1 Studienplanung und –ablauf

Ausgangsmaterial für die Testreihen war das venöse Blut von gesunden männlichen Probanden.
Vor der Blutentnahme erfolgte eine ausführliche Aufklärung der Versuchspersonen und die schriftliche Einverständniserklärung zur Aufnahme in die Studie.
Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm unter der Nummer 28/97 geprüft und genehmigt.

1.2 Probandenkollektiv

Ausgewertet wurden insgesamt 43 Patientenproben. Jede dieser Proben wurde an 3 Substanzen getestet. Dadurch konnte einerseits eine generelle Genotoxizität der Substanz nachgewiesen werden, andererseits war auch ein Vergleich der Substanzgenotoxizität untereinander an einem identischen Zellkollektiv möglich.

Als Probanden dienten männliche Soldaten im Alter von 20 bis 57 Jahren.
Der Raucheranteil des getesteten Kollektivs betrug 61,1 %.

2 Material und Methoden

2.1 Lymphozytenseparation:

Die Lymphozyten wurden durch Blutabnahme aus venösem Blut von gesunden männlichen Soldaten gewonnen, die zu kleineren, nicht-onkologischen Operationen (z.B. Tonsillektomie, Nasennebenhöhlenoperation, Nasenseptumbegradigung) stationär im Bundeswehrkrankenhaus Ulm aufgenommen worden sind.

Die Versuchsreihe umfasste Proben von 43 männlichen Probanden im Alter vom 22 bis 57 Jahren. Die für die Versuche verwendeten Substanzkonzentrationen sind unter Punkt 2.4.4. nach Substanzgruppen geordnet aufgelistet.

2.2 Materialien und Reagenzien

2.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Bei der Durchführung des Versuchs wurden folgende Chemikalien eingesetzt:

Agarose, als Sea Plaque GTG (low melting) und Sea Kem LE (pure) –
*bezogen von **Firma Biozym, 31833 Hess. Oldendorf***

Aqua dd; Propanol 97%–
*bezogen von **BWK Apotheke, 89070 Ulm***

FCS (fötales Kälberserum) –
*bezogen von **Fa. Boehringer, 68159 Mannheim***

Lymphoprep –
*bezogen von **Nycomed Pharma AS, Oslo Norway***

NaCl 0,9% –
bezogen von ***B. Braun AG, 34209 Melsungen***

Natriumhydrogencarbonat, Natriumchlorid, HCl 1-molar, HCl rauchend, NaOH 1-molar, Natriumhydroxyd-Plätzchen, Titriplex (Na_2EDTA), Dimethylsulfoxid (DMSO), Kaliumdihydrogenphosphat und Methyl-p-benzoesäure–
bezogen von ***Merck Pharma KgaA, 64271 Darmstadt***

RPMI, PBS (steril) –
bezogen von ***Life Technologies, 76344 Eggenstein***

Trispuffer ($C_4H_{11}NO_3$), N-Lauroyl- Sarcosinat($C_{15}H_{28}NO_3Na$), Triton X-100, Ethidiumbromid –
bezogen von ***Sigma Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim***

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Kryoröhrchen (Nunc Cryo Flex Tubing) 1,8 ml
bezogen von ***Nalge Nunc International, Denmark***

Reaktionsgefäße 50ml Blue Cap, Reaktionsgefäße 10ml, Serologiepipetten 10ml
bezogen von ***Falcon Becton Dickinson Labware, New Jersey USA***

Reaktionsgefäße 1,5ml
bezogen von ***Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, 22331 Hamburg***

Sterile Spritzenfilter 0,22µm, Parafilm, Objektträger einseitig matt 26*76mm und Deckgläser 24x70mm (Glasdicke 0,08-0,12mm)
bezogen von ***Fa. Langenbrink, 79312 Emmendingen***

Glasgefäße und Färbezubehör
bezogen von ***Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe***

Pipettenspitzen gelb und blau, NH_4-Heparin Blutabnahmeröhrchen, Multiadapter (pyrogenfrei) steril
bezogen von ***Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht***

Sterile Kompressen, unsterile Kompressen und Abdeckmaterial
bezogen von ***Fa. Hartmann, 89522 Heidenheim***

Einmalhandschuhe, Gentle Skin Classic® 100 Stück
bezogen von ***Meditrade GmbH, 83088 Kiefersfelden***

Surflo winged infusion set
bezogen von ***Terumo Europe N.V., 3001 Leuven, Belgium***

Kodan Tinktur Forte farblos, alkoholisches Hautantisept
bezogen von ***Schülke&Mayr, 22840 Norderstedt***

2.2.3 Geräte

Folgende Geräte wurden zur Versuchsdurchführung benötigt:

Elektronische Analysewaage Sartorius 210 D
Sartorius AG, 37070 Göttingen

Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R
Heraeus Instruments GmbH, 70736 Fellbach

Wasserschüttelbad Julabo SW 20
Julabo Labortechnik GmbH, 77960 Seilbach

Mikropipetten Eppendorf Reference 50 µl / 100 µl / 10-100µl / 100-1000µl
Eppendorf-Netheler Hinz GmbH, 22331 Hamburg

Zählkammer nach Neubauer
Fa. Marienfeld über Fa. Carl Roth, 76185 Karlsruhe
Cryo Einfriergerät mit Abkühlrate 1°C pro Minute
Nalgene Nunc International, USA

Carl Zeiss Mikroskop mit Neofluar 40 und 10x Okular
Carl Zeiss AG, 37081 Göttingen

Magnetrührer Variomag
HP Labortechnik, 85764 München

Knick pH-Meter 766 Calimatic
Knick elektronische Meßgeräte GmbH & Co., 14163 Berlin
Elektrophorese Stromversorgung Biometra Power Pack P25
Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, 37079 Göttingen

Elektrophoresewanne Geltray
Renner GmbH, 67125 Dannstadt

Glasgravurgerät
Fa. Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe

Bunsenbrenner und Nachfüllkartusche
Fa. Camping-Gaz Deutschland, 65780 Hattersheim

Mikrowellenofen Siemens HF 11920, Kühlschrank Siemens FD 7202
Siemens AG, 80076 München

Fluoresezensmikroskop Olympus BX 40 mit Olympus Plan 20x Objektiv und 10x Stereookular, Olympus Lampenbrenner BH-2-RFL-T-3 – *Fa. Olympus Wendenstraße 14-18, 20097 Hamburg*

Mikroskop über Hitachi CCD Videokamera mit Bildverarbeitungsprogramm Comet 3.1 Europe, *Fa. Kinetic Imaging UK*, gekoppelt – *Fa. Optilas, 82178 München*

2.2.4 Testsubstanzen und deren chemisch-toxikologische Einteilung

Die für den Versuch benötigten toxikologischen Substanzen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. M. Faulde vom Zentralen Untersuchungsinstitut der Bundeswehr in Koblenz bei nachfolgend angegebenen Bezugsquellen erworben und für die Versuchsreihen zur Verfügung gestellt.

Amitraz (99,0%)	AgrEvo GmbH, Frankfurt, BRD
Bioresmethrin (95,4%)	Reinelt & Tempo GmbH, Köln, BRD
Cyfluthrin (94,9%)	Bayer AG, Leverkusen, BRD
Phenothrin = Sumithrin (94,3%)	Sumitomo Chemicals, Osaka, Japan
Permethrin (94,8%; cis:trans=25:75)	Winkler GmbH, Ahrensburg, BRD

Transfluthrin (96,1%)	Bayer AG, Leverkusen, BRD
Diazinon (95,4%)	Neudorff GmbH, Emmerthal, BRD
Piperonylbutoxid (90%)	Sigma-Aldrich Chemicals Co, Steinheim, BRD
Naturpyrethrum (50% (w/w))	Pyrethrum Bord of Kenya, Nakuru Kenya
Malathion (99,2%)	Reinelt & Temp GmbH, Köln, BRD
Pyridostigminbromid (99,2%)	Bundeswehrapotheke, Koblenz, BRD
Fipronil (95,5%)	BASF AG, Limburgerhof, BRD
Silafluophen (95,2%)	AgrEvo GmbH, Frankfurt, BRD
Fenpyroximate (99,4%)	Nihon Nohyaku Co., Tokyo, Japan
DEET (purum)	Fluka Chemie AG, Buchs,Schweiz
3535 (technisch rein)	Merck, Darmstadt, BRD
Dimethylphthalat (purum)	Merck, Darmstadt, BRD

2.3 Lösungen

2.3.1 Gebrauchslösung zur Vitalitätsbestimmung der Lymphozyten

Zur Zellzählung und Vitalitätsbestimmung unter dem Mikroskop wurde der Trypanblau Ausschlußtest verwendet. Nachfolgend ist die Rezeptur der Gebrauchslösung aufgeführt:

400 mg Trypanblau wurden mit 810mg NaCl, 50 mg Methyl-p-benzoesäure und 60 mg KH_2PO_4 gemischt, mit Aqua dd auf 100ml aufgefüllt und auf einen pH von 7,2 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung steril abfiltriert und abgefüllt.

2.3.2 Lösungen zur Durchführung der Mikrogelelektrophorese

Lysestammlösung

Für die Lysestammlösung wurde 292,8g NaCl, 74,4g Na_2EDTA, 2,4g Tris-Base und 20,0g Na_2Sarcosinat getrennt in Lösung gebracht, später gemischt und dann mit NaOH auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Abschließend erfolgte ein Auffüllen mit Aqua bidest auf 2 Liter.
Die Gebrauchslösung für den Versuch bestand aus 89ml Stammlösung, 10ml DMSO und 1ml Triton-X-100.

Neutralisationsstammlösung
48,5 g Tris Base mit 1l Aqua dd mischen und mit Hilfe von konzentrierter HCl 37% (rauchend) nach pH-Meter auf pH-Wert von 7,5 einstellen.

Die Lysestammlösung und die Neutralisationsstammlösung wurden auf Vorrat hergestellt und mußten nicht für jeden Versuch neu angesetzt werden.

Färbelösung

Für die Stammlösung löste man 10 mg Ethidiumbromid in 50 ml Aqua dd, die bei 4°C im Kühlschrank gelagert wurde.

Für die Gebrauchslösung wurde eine weitere Verdünnung auf ein Mischverhältnis von 1 : 10 durchgeführt und anschließend durch einen 0,22µm Filter sterilfiltriert und abgefüllt. Wegen der Lichtempfindlichkeit der Lösung wurde sie im Kühlschrank zusätzlich in Alufolie eingewickelt gelagert.

Folgende Lösungen wurden für jeden Versuch neu angesetzt:

*Tieffriermedium für 3 Kryoröhrchen:

2,5 ml RPMI, 2 ml FCS, 0,5 ml DMSO. FCS muß Raumtemperatur haben.

*Lysepuffer

Für 100ml Lysepuffer waren erforderlich:

1ml Triton-X-100, 10 ml DMSO, 89ml Lysestammlösung.

*Elektrophoresepuffer

24 g NaOH Plätzchen und 0,744 g Na_2EDTA mit 2 l Aqua dd mischen.

Für das Befüllen einer Elektrophoresewanne waren 2000 ml Elektrophorese-puffer erforderlich.

* Agarose:

Für die Beschichtung der Objektträger waren verschiedene Agaroseträgerschichten notwendig. Da die Agarose bei Raumtemperatur als Feststoff vorlag, mußte sie zum Auflösen mit PBS im Mikrowellenherd erhitzt werden. Die flüssige Konsistenz wurde in einem 37°C warmen Wasserbad bis zur Verarbeitung erhalten.

Vor Beschichtung wurden alle Objektträger rechts unten mit fortlaufenden Nummern graviert und die Nummer zur besseren Kennzeichnung mit Bleistift nachgezogen.

Die Agaroselösung für die Grundschicht entstand durch Lösen von
100 mg Sea Kem pure in 10 ml PBS (Agarose 1%). Die zweite Schicht enthielt 50 mg Sea Kem pure in 10 ml PBS (Agarose 0,5 %).
Nach Pipettieren der zweiten Schicht wurde die noch flüssige Agaroseschicht mit einem Deckglas abgedeckt. Dies führte zur gleichmäßigen Verteilung der Agarose auf dem Objektträger. Waren alle Objektträger so vorbereitet, wurden sie in den Kühlschrank gestellt. Dies ergab verbesserte Ergebnisse beim Aushärten der Agaroseschichten, was sich in einem homogeneren Bild unter dem Mikroskop später widerspiegelte.
Die 70 mg Sea Kem low-melting Agarose in 10 ml PBS bildeten die dritte und vierte Schicht (Agarose 0,7%). Einmal wurde sie zur Verteilung der Zellen auf dem Objektträger benötigt und zum zweiten abschließend als Abdeckschicht zum Schutz der in Agarose eingebetteten Zellen verwandt.

2.4 Versuchsaufbau

Wir verwendeten in unserer Arbeit die Mikrogelelektrophorese, auch Comet Assay genannt.

Die Geschichte der Mikrogelelektrophorese reicht bis ins Jahr 1978 zurück, in dem Rydenberg und Johanson erstmals der Nachweis einer durch Bestrahlung von Zellkernen induzierte DNS-Schädigung gelang. [122]

1984 wurde die Methode von Oestling und Johansen durch eine Elektrophorese unter neutralen pH-Bedingungen nach Bestrahlung und Zellyse erweitert. [97]

Zellen mit stärkeren DNS-Schäden zeigten dabei eine vermehrte Migration zur Anode.
Mikroskopisch zeigte sich nach Fluorszenzfärbung dann der für die englische Bezeichnung „comet assay“ maßgebliche Komet, der durch den im Kopf bestehenden ehemaligen Zellkern und durch den im Schweif geschädigten DNS-Anteil charakterisiert ist.

Größe und Fluoreszenzintensität des Schweifs nehmen mit steigendem Schädigungsgrad der Zelle zu. Dabei ergibt sich eine weitgehend proportionale Beziehung zwischen Schädigungsgrad und Kometenlänge [5].

1988 wurde die Methode durch eine stark alkalische Lyse- und Elektrophoreselösung von Singh et al. entscheidend verbessert [122].

2.4.1 Lymphozytenseparation

Von jedem Probenspender wurden drei 10 ml NH_4-Heparin Röhrchen Blut abgenommen. Es erfolgte nun die Lympozytenseparation.

Dazu wurden auf ca. 13 ml Lymphoprep 13 ml Blut in ein Bluecap pipettiert. Die Lymphopreplösung hatte dazu Raumtemperatur.
Wichtig war das vorsichtige Aufpipettieren des Blutes, um eine Durchmischung der beiden Phasen zu vermeiden.

Das Bluecap wurde nun 20 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute und 23°C zentrifugiert.
Durch das Zentrifugieren ergab sich eine Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile in drei Phasen.

Mit einer Pasteurpipette wurde nun vorsichtig die schmale Lymphozytenbande zwischen Erythrozyten und Serum in 13 ml Röhrchen abpipettiert ohne die Phasen zu vermischen.

Die Lymphozyten (ca. 5-6 ml) wurden nun mit sterilem PBS auf insgesamt 10-11 ml aufgefüllt. So ergab sich ein Mischverhältnis von 1 : 1. Es folgte nun die nochmalige Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute und 23°C.

Nun wurden die Röhrchen vorsichtig aus der Zentrifuge entnommen und der Überstand an Flüssigkeit dekantiert.
Übrig blieb ein Zellpellet, das nun vorsichtig mit drei ml Tieffriermedium resuspensiert wurde. Die Probe wurde in 3 Portionen kryokonserviert.

Die Kryoröhrchen wurden dazu in ein mit 97% Isopropanol gefülltes Kryoeinfriergerät einsortiert und bei –80°C in die Tiefkühltruhe gestellt.
Das Isopropanol sollte das zu schnelle Tieffrieren verhindern, da sonst möglicherweise zusätzliche Zellschäden entstanden wären. Nach frühestens 4 Stunden waren die Röhrchen umsortierbar.
Auf die oben beschriebene Weise konnte ein Lymphozytenpool von 120 Probanden gewonnen werden, aus dem blind 43 für die Studie ausgewählt wurden. Jede Substanz wurde an 5 Patienten getestet.

2.4.2 Bereitstellung der Zellen für den Versuch, Vitalitätsbestimmung und Zellzählung

Die Proben wurden bei Raumtemperatur ca. 10-15 min aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 13 ml Röhrchen überführt und 10 Minuten mit 2000 U/min bei 4°C zentrifugiert.
Das Pellet wurde mit 1 ml sterilem PBS resuspendiert, so ergab sich die für den Versuch erforderliche Zellsuspension.

Nun wurde die Zellzahl bestimmt und die Vitalitätsprobe vorgenommen, um Zellmengen unter 20 µl zu vermeiden.

Dazu wurde der Trypanblauausschlußtest nach Phillips durchgeführt. [103]
Aus jeder Zellsuspension wurden 50µl entnommen und mit 50µl Trypanblau gemischt. Mittels einer Neugebauer Zählkammer wurde nun einerseits die Zellzahl ermittelt und gleichzeitig das Verhältnis von vitalen (ungefärbten) zu avitalen (blau gefärbten) Zellen, also die Vitalität der Zellsuspension bestimmt.
Für die Vitalität der Zellsuspension und damit Einschleusung in die Versuchsreihe wurde ein Mindestausgangswert von 90% vitalen Zellen gefordert.
Der Trypanblauausschlußtest wurde vor jedem Start einer Versuchsreihe und nach einer Stunde Inkubationszeit der Zellen mit den genotoxischen Substanzen durchgeführt.

2.4.3 Verdünnungsreihen bei Substanzen mit bekanntem Molekulargewicht

Die Konzentration der Toxine sollte in 1ml Zellmedium 1mM sein.
Dazu wurde bei jeder Toxinversuchsreihe vor Einwaage 100 µl DMSO vorgegeben. Die Substanzmenge (= Einwaage) wurde mit 10 µl festgesetzt und

pipettiert.Um die für eine 1M Lösung erforderliche Menge an DMSO zu ermitteln, wurde folgende Formel angewandt:

$$X = EW : (MG/10)$$

EW = Einwaage; MG = Molekular Gewicht; Molare Masse

Vom Ergebnis wurden 110 µl (=100 µl DMSO+ 10µl Substanz) abgezogen. Es ergab sich so die Menge in µl DMSO, die zupipettiert werden mußte. Auf diese Weise erhielt man die 1mMolare Lösung.
Um daraus eine 0,75 mMolare Lösung zu gewinnen, wurden aus der
1,0 mMolaren Lösung 100µl entnommen und mit 50 µl DMSO gemischt.
Für eine 0,5 mM Lösung wurden 100 µl der 1,0 mMolaren Lösung mit 100 µl DMSO vermischt.

2.4.4 in vitro Applikation der Testsubstanzen

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die benötigte Mediummenge ermittelt, die sich durch die Differenz zwischen der auf 100 µl festgesetzten Endmenge und der errechneten Zellzahl plus Substanzmenge (10 µl) ergab.

Die Pipettierreihenfolge bei der in vitro Applikation ergab sich wie folgt: Medium (RPMI+FCS), dann die Zellen, zum Schluß die Substanz zupipettieren.
Danach erfolgte eine einstündige Inkubation im Wasserschüttelbad bei 37°C. Mit Beginn der Inkubation wurde unter Rotlicht gearbeitet, um lichtinduzierte genotoxische Schäden an den Zellen zu vermeiden.

Getestet wurden die folgenden Einzelsubstanzen und Kombinationen (Konzentration in mM/ml Zellsuspension, Lösungsmittel bei allen Substanzen DMSO):

Akarizide	
Amitraz	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Pyrethroide	
Bioresmethrin	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Cyfluthrin	0,5 /0,75 /1,0 mM
Phenothrin	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Permethrin	0,25 / 0,5 / 0,75 /1,0 mM
Transfluthrin	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Thiophosphonate	
Diazinon	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Glykolether	
Piperonylbutoxid	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Naturstoffe	
Naturpyrethrum	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Cholinesterasehemmstoffe	
Malathion	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Acetylcholinesterasehemmstoffe und Carbamate	
Pyridostigminbromid	0,25 / 0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Hemmung des GABA regulierten Chloridkanals	
Fipronil	0,5 / 0,75 / 1,0 m M

Silane	
Silafluophen	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Akarizide	
Fenpyroximate	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Insektenrepellentien	
3535	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
DEET	0,25 / 0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Dimethylphthalat	0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Substanzkombinationen	
DEET-Pyridostigminbromid	0,25 / 0,5 / 0,75 / 1,0 mM
DEET-Permethrin	0,25 / 0,5 / 0,75 / 1,0 mM
Pyridostigminbromid-Permethrin	0,25 / 0,5 / 0,75 / 1,0 mM
DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin	0,25 / 0,5 / 0,75 / 1,0 mM

Die Auswahl der Substanzen und Festlegung der zu testenden Konzentrationen erfolgte aufgrund der bereits durchgeführten Genotoxizitätsnachweisen an humanen Tonsillenzellen. [138]

2.4.5 Toxizitätstest

Kurz vor Ablauf der 60-minütigen Inkubationszeit wurde von jeder Konzentration erneut eine Probe entnommen und nochmalig der Trypanblauausschlußtest durchgeführt, um die zytotoxische Wirkung der jeweiligen Testsubstanz in der verwendeten Konzentration zu ermitteln.

2.4.6 Vorbereitung der Objektträger bis zum Aufbringen der Zellen

Für jede Substanz waren bei Doppelbestimmung 7 Objektträger nötig. Es wurden mattierte Objektträger verwendet.
Vor Versuchsbeginn mußten diese über einem Bunsenbrenner vorsichtig abgeflammt werden, um den durch die Herstellung bestehenden Ölfilm zu entfernen.

Die erste Beschichtung der Objektträger erfolgte mit 700 µl Agarose 1,0%.
Diese erste Schicht diente der besseren Haftung der später aufzutragenden Schichten und wurde nach dem Aushärten der Agarose wieder abgestreift.
Die zweite Schicht mit 85 µl Agarose 0,5% wurde sofort nach Aufbringen mit einem Deckglas bedeckt, um ein gleichmäßigeres Aushärten der Agarose zu erreichen. Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Objektträger zum weiteren Aushärten in einer feuchten Kammer im Kühlschrank gelagert.
Generell war es wichtig bei jedem Auftragen von Agarose auf die Gleichmäßigkeit der Beschichtung zu achten, um einen homogenen Hintergrund bei der Auswertung zu erreichen, um diese nicht unnötig durch Nachjustieren und Scharfstellen zu erschweren. Ein weiterer Vorteil lag darin, daß sich die Zellen in diesem Falle nicht in unterschiedlichen Schichten Agarose auf dem Objektträger befanden, sondern in einer Justierebene lagen.

2.4.7 Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Zellen erneut bei 4°C mit 400 U/min für insgesamt 5 Minuten zentrifugiert.

Nun wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Dabei wurde das Röhrchen entsprechend der Zentrifugalkraft gehalten, um eine Resuspension des Zellpellets mit dem Medium zu vermeiden.

Es erfolgte nun das Aufbringen der zelltragenden Schicht auf die Objektträger. Dazu wurden 65 µl Agarose kreisförmig in das Röhrchen pipettiert und dabei das Röhrchen mehrfach gedreht, um möglichst viele Zellen aufnehmen. Anschließend wurden die so resuspendierten Zellen auf die Objektträger aufgebracht.

Nun wurde eine letzte Schicht mit Agarose (low melting) 0,7 aufgetragen. Um die Homogenität der Agarosebschichtung zu gewährleisten, wurde ein Deckglas aufgebracht. Danach wurden die Objektträger zur Aushärtung einige Minuten liegengelassen.
Abschließend wurden die Deckgläser abgezogen und die Objektträger in Färbeküvetten geschichtet.
Pro Färbeküvette wurden ca. 100 ml Lysepuffer eingefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich die empflindliche Agaroseschicht keinesfalls löste. Die Färbeküvette wurde mit Alufolie umwickelt und zur Lyse der Zellmembranstrukturen eine Stunde bei +4°C gelagert.
Vorbereitung der Elektrophorese:

Der dazu benötigte Elektrophoresepuffer wurde mit dem Magnetrührgerät aus (pro Elektrophoresewanne) 24 g NaOH Plätzchen, 0,744 g Na_2EDTA (Titriplex) und 2 l Aqua dd gewonnen.
Für das gleichmäßige Ausrichten der Kometen in der Auswertung mittels Comet Assay war die möglichst waagerechte Stellung der Elektrophoresewanne im Eisbad von entscheidender Bedeutung. Dazu wurde die Elektrophoresewanne mittels Stellrädern und einer eingebauten Wasserwaage in der Plastikwanne

austariert. Die Plastikwanne wurde anschließend gleichmäßig mit einer Mischung aus Eis und Wasser aufgefüllt. In die Elektrophorerewanne wurde der Elektrophoresepuffer bis zur Horizontalen eingefüllt.

Nach Ablauf der Lysezeit konnten die Objektträger vorsichtig der Färbeküvette entnommen und anschließend in die Elektrophoresewanne angeordnet werden. Waren alle Objektträger plaziert, wurden sie mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Dies mußte sehr vorsichtig geschehen, um ein Abschwimmen der Objektträger zu vermeiden.

Es folgte nun eine Inkubationszeit von 20 Minuten, um einen ausreichenden Ionenaustausch zwischen Pufferlösung und Agaroseschichten zu gewährleisten. Danach erfolgte die 20-minütige Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 25 V und 300 mA. Zu Beginn der Elektrophorese lag meist eine Abweichung der Stromstärke vor. Diese konnte durch zu- bzw abpipettieren von Elektrophoresepuffer ausgeglichen werden. 1mA entsprach dabei 1ml Elektrophoreselösung.

Nach Ablauf der 20-minütigen Elektrophorese konnten die Objektträger der Elektrophoresewanne entnommen und auf einer Färbebank angeordnet werden. Im Abstand von ca. 2-3 Minuten wurden sie nun mehrfach mit Neutralisationspuffer gespült. Jeder Objektträger wurde dann mit 100 µl Ethidiumbromid angefärbt. Dabei war auf ein äußerst sauberes Arbeiten unter Eigenschutz (Laborbrille und Handschuhe) zu achten, da Ethidiumbromid kanzerogene Wirkung besitzt. Abschließend wurde ein Deckglas aufgebracht und die Objektträger in mit angefeuchtetem Zellstofft ausgelegte Archivkästen einsortiert.

2.4.8 Auswertung

Das Ausmaß der Zellschädigung wurde an einem Olympusmikroskop mit Fluoreszenzgenerator und angeschlossener Videokamera bestimmt. Das Videobild wurde mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware der Firma Kinetic ausgewertet.

Pro Objektträger wurden durch mäanderformiges Absuchen zufällig 41 Zellen für die Auswertung ausgewählt. Intakte, d.h. nicht genotoxisch geschädigte, Zellen stellten sich dabei als runder Nukleus dar, geschädigte Zellen wiesen einen Kometen mit stark fluoreszierendem Kopf und Schweif auf.

Größe und Fluoreszenzintensität des „Kometen-Schweifes“ stiegen dabei proportional zur Intensität der Zellschädigung, während der „Kometen-Kopf“, bis zu stecknadelkopfgroß und kleiner werden konnte.

Artefakte, überlappende Kometen sowie Zellen im Randbereich wurden nicht ausgewertet, Falschmessungen nachträglich gelöscht.

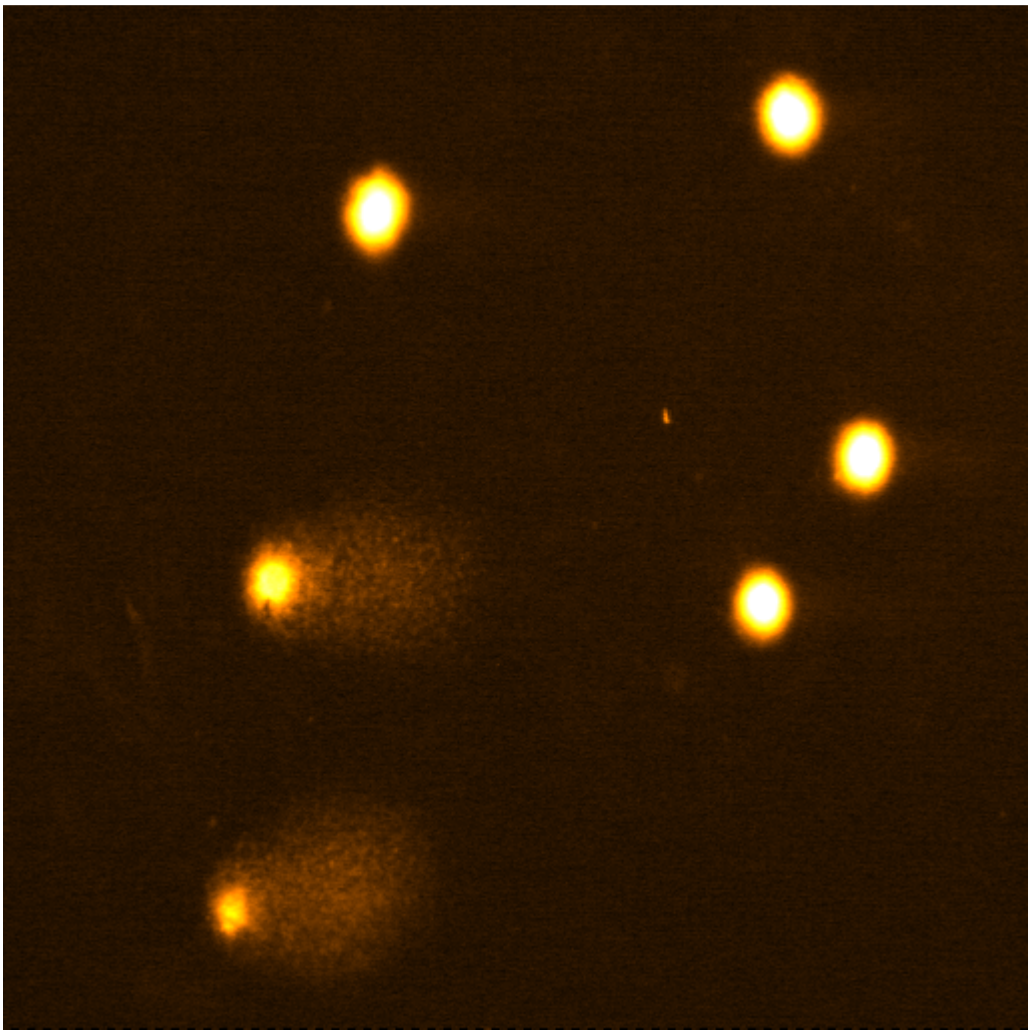

Abb.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von humanen Lymphozyten nach Behandlung mit Insektiziden (20-fache Vergrößerung)

Falschmessungen kamen dadurch zustande, dass die Bildverarbeitungssoftware automatisch den intensiveren Kometenteil als Kopf definiert. Im Datensatz war dies durch eine negative Ausrichtung der Werte des Olive Tail Moment, also entgegen des Elektrophoresestroms, erkennbar.

Jeder gemessene Komet wurde per Exel-Makro in einen einseitigen Datensatz umgewandelt und dieser zur Datensicherung gespeichert. Für die Auswertung der Testreihen und ihren Vergleich waren vor allem die Werte Tail Extent (TE) und Olive Tail Moment von Bedeutung.

Der einzelne Komet wurde durch das Mikroskopokular ausgewählt. Vom aktuellen Videobild entstand dann ein Standbild. Die Bildverarbeitungssoftware markierte dabei das Ausmaß des Kometen und errechnete den entsprechenden Datensatz, der in Form einer einseitigen Mikrosoft-Exeldatei abgespeichert wurde. Die Abmessung des Kometen erfolgte nach dessen Ausdehnung und der Helligkeitsverteilung. Bei einer Fehlmessung, die durch die Tendenz der Software den intensiveren Kometenanteil als Kopf zu werten entstand, konnte die Messung auch manuell durchgeführt werden. Dabei wurden Kopf oder Schwanz des Kometen mittels Cursor markiert und die Messung bestätigt.

In einer weiteren Auswertung wurde der 1-seitige Datensatz, der viele verschiedene Meßparameter wie z.B. prozentualer DNS Gehalt im Kopf, prozentualer DNS Gehalt im Schweif, gesamter DNS Gehalt, Radius des Kopfes, Schweiflänge etc. auf drei Werte reduziert:

- OTM = Olive Tail moment absolut ohne physikalische Einheit,
  % DNS im Cometenschweif x Abstand zwischen Kopf- und Schweifzentrum;
  (zusätzlich zu den Längenmaßen werden hierbei auch Leuchtintensitäten an Kopf und Schwanz berücksichtigt)
- TE = Tail extent in Mikrometer (entspricht der Schweiflänge)
- OTM<2 = ein aus allen Zellen der Spalte OTM ausgezählter Wert.
- OTM = 2 stellte den Grenzwert zwischen nicht und deutlich geschädigten Zellen dar.
- OTM<2 entsprach dem Anteil an nicht bzw. gering geschädigten Zellen.
- OTM>2 repräsentierte genotoxisch geschädigte Zellen des Kollektivs.

Im Ergebnisteil werden die einzelnen Testreihen graphisch und tabellarisch dargestellt.

2.5 Statistik

Aufgrund der geringen Probandenzahlen (5 pro Testsubstanz) wurde auf eine ausführliche Statistik verzichtet. Die ermittelten Werte (pro Objektträger 41 bestimmte Zellen, pro Testsubstanz 5 verschiedene Probanden) für OTM, TE und OTM<2 wurden tabellarisch erfaßt und Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Abschließend erfolgte eine graphische Darstellung der Werte, in Form von drei Kurven, die für jede Testsubstanz individuell verschieden waren.

3 Ergebnisse

Die Testreihen wurden mit folgenden Substanzgruppen/Substanzen durchgeführt:

Triazapentadien	Amitraz
Pyrethroide	Bioresmethrin, Cyfluthrin, d-Phenothrin, Permethrin, Transfluthrin
Thiophosphate	Diazinon
Glykolether	Piperonylbutoxid
Naturstoffe	Naturpyrethrum
Cholinesterasehemmstoffe	Malathion
Acetylcholinesterasehemmstoff und Carbamat	Pyridostigminbromid
Hemmung des GABA regulierten Chloridkanals	Fipronil
Silane	Silafluophen
Akarizide	Fenpyroximat
Untergruppe Pyrazoloximether	

Insect Repellent, Untergruppe Ester, Amide	DEET, 3535, Dimethylphthalat
Kombinationssubstanzen	DEET-Pyridostigminbromid DEET-Permethrin Permethrin-Pyridostigminbromid DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin

3.1 Versuchsablauf bis zur Mikrogelelektrophorese

Grundlage des Versuchs war ein Anteil vitaler Zellen von mindestens 90%, d.h. als minimale Ausgangszellmenge, um noch genau pipettieren zu können, wurden 20µl festgesetzt.

Waren bei einer Probe diese Voraussetzungen nicht erfüllt, wurde sie vom Versuch ausgeschlossen und verworfen.

Für jede Substanzkonzentration wurden zwei Objektträger angelegt und damit eine Doppelbestimmung durchgeführt. In der Auswertung wurden pro Objektträger 41 Zellen vermessen.

Das Olive Tail Moment der Lösungsmittelkontrollen wurde mit einem Wert kleiner 2 festgesetzt. Höhere Werte führten zum Ausschluß der Datenreihe, da von einer zu hohen Grundschädigung der Lymphozyten auszugehen war.

Insgesamt wurde jede Probe an 3 Substanzen getestet.

3.2 Ergebnisse der Versuchsreihen

Die Testergebnisse jeder Substanz sind im Folgenden graphisch und tabellarisch dargestellt.

Legende der Graphiken:

♦	OTM (Olive Tail Moment)
●	TE (Tail Extent)
▲	OTM<2 (Olive Tail Moment kleiner 2)

Die Ergebnisse sind tabellarisch als Mittelwert der durchgeführten Zweifachbestimmung in µmol/ml Zellsuspension dargestellt. Zusätzlich ist die daraus resultierende Standardabweichung angeben.

In der tabellarischen Darstellung sind die Ergebnisse der Lösungsmittelkontrolle mit DMSO (also ohne Substanz) und die Ergebnisse für die jeweilige Substanz in aufsteigender molarer Konzentration angegeben. Die in den Versuchsreihen bestimmten Parameter sind das Olive Tail Moment (OTM), der Tail Extent (TE) und das Olive Tail Moment kleiner 2, sowie deren errechneter Mittelwert und Standardabweichung.

3.2.1 Triazapentadien

Aus der Gruppe der Triazapentadien wurde Amitraz für den Versuch ausgewählt.

3.2.1.1 Amitraz

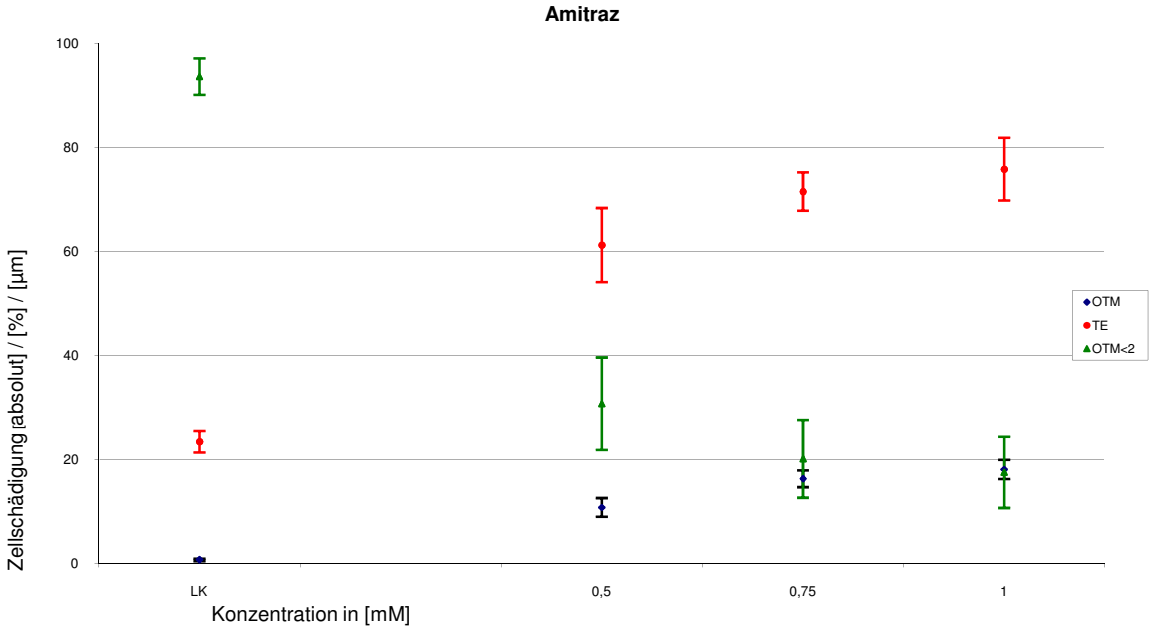

Abb. 2: Amitraz

Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 2 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Amitraz dargestellt. Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 23,4µm.

Nach Inkubation mit Amitraz ergab sich folgendes:
In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 10,8. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 61,2µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung: Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,68 absolut auf 10,77 in der 0,5 mM Konzentration, 16,27 in der 0,75 mM und schließlich auf 18,08 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 23,4µm in der Lösungsmittelkontrolle auf 61,2µm (0,5 mM/ml) dann auf 71,48µm (0,75 mM/ml) bis zu 75,8µm in der 1,0 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 93,6% in der Lösungsmittelkontrolle auf 30,6% (0,5 mM/ml) dann auf 20,1% (0,75 mM/ml) und schließlich bis auf einem Wert von 17,5% in der 1 mM Amitrazlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 17,5% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Amitrazlösung, dann auf 85,3% (0,75 mM/ml) und schließlich bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.2 Pyrethroide

Aus der Gruppe der Pyrethroide wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Substanzen getestet:

- Bioresmethrin
- Cyfluthrin
- Phenothrin
- Permethrin
- Transfluthrin

3.2.2.1 Bioresmethrin

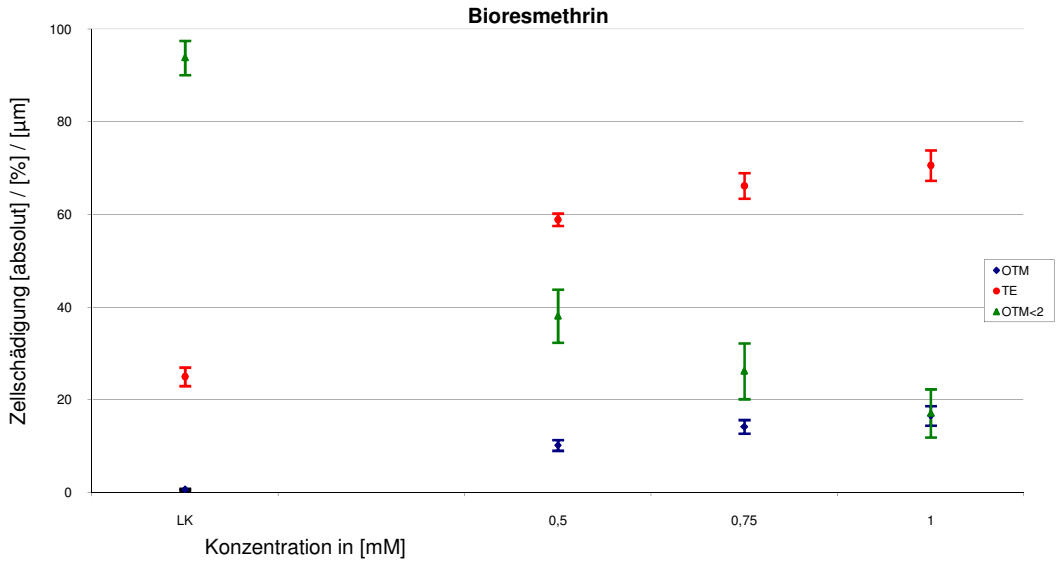

Abb 3: Bioresmethrin
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Bioresmethrin dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 25µm.

Nach Inkubation mit Bioresmethrin ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 10,2. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 58,9 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:
Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,64 absolut auf 10,2 in der 0,5 mM Konzentration, 14,21 in der 0,75 mMolaren und schließlich auf 16,57 in der 1 mMolaren Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 25 µm auf 58,9 µm (0,5 mM/ml), dann auf 66,2 µm (0,75 mM/ml) und schließlich bis zu einem Wert von 70,6µm in der 1,0 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 93,8% in der Lösungsmittelkontrolle auf 38,1% (0,5 mM/ml), dann auf 26,2% (0,75 mM/ml) und sank schließlich bis auf einem Wert von 17,1% in der 1 mM Bioresmethrinlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 17,1% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Bioresmethrinlösung, auf 85,3%
(0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.2.2 Cyfluthrin

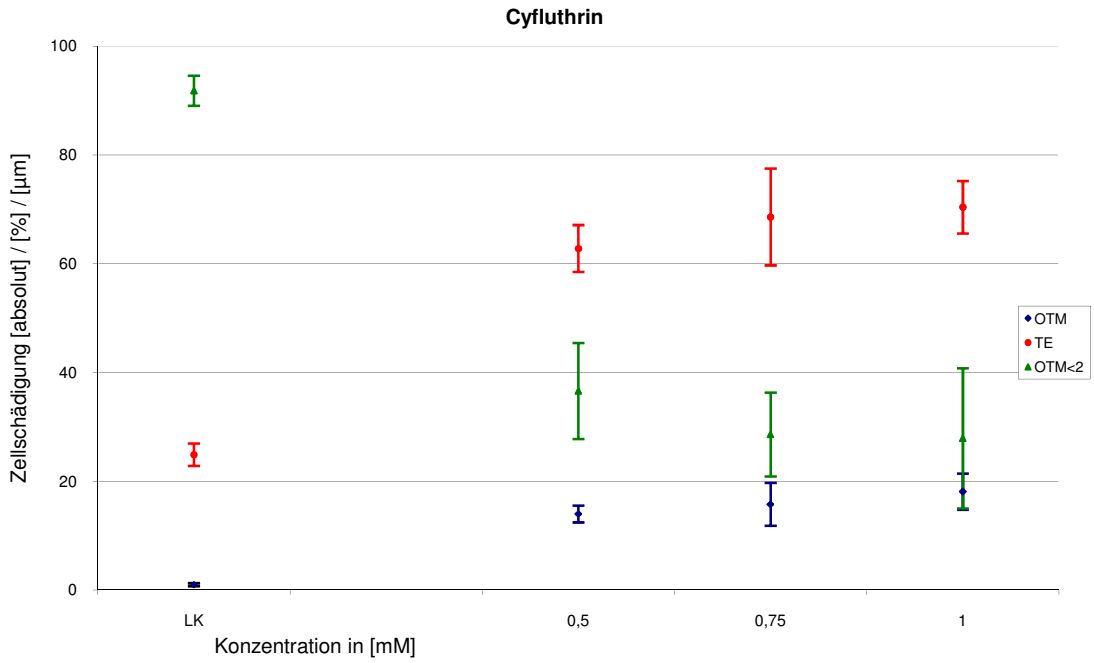

Abb 4: Cyfluthrin
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Cyfluthrin dargestellt. Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 24,9 µm.

Nach Inkubation mit Cyfluthrin ergab sich folgendes:
In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 14. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 62,8 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:

Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,99 absolut auf 14 in der 0,5 mMolaren Konzentration, 15,77 in der 0,75 mMolaren und schließlich auf 18,1 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 24,9 µm auf 62,8 µm (0,5 mM/ml), stieg dann auf 68,6 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 70,4 µm in der 1,0 mMolaren Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 91,8% in der Lösungsmittelkontrolle auf 36,6% (0,5 mM/ml), sank dann auf 28,6% (0,75 mM/ml) und erreichte abschließend einen Wert von 27,9% in der 1 mM Cyfluthrinlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 27,9% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Cyfluthrinlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.2.3 Phenothrin

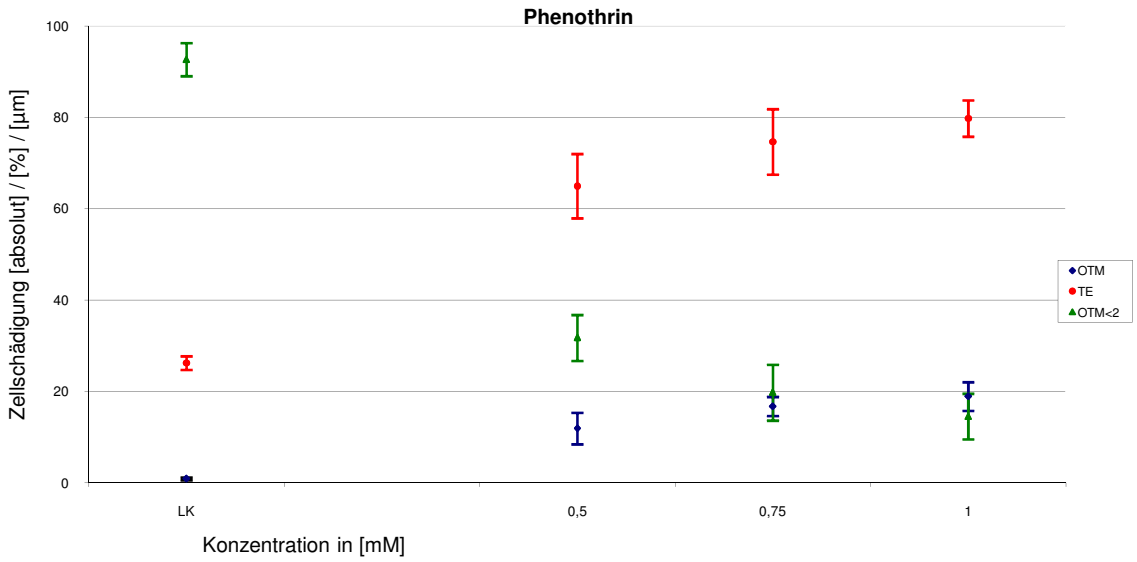

Abb 5: Phenothrin
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Phenothrin dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 26,3 µm.

Nach Inkubation mit Phenothrin ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 11,96. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 65 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung: Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in

der Lösungsmittelkontrolle mit 0,96 absolut auf 11,96 in der 0,5 mMolaren Konzentration, 16,77 in der 0,75 mM und schließlich auf 18,96 in der 1,0 mMolaren Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 26,3 µm auf 65 µm (0,5 mM/ml), stieg dann auf 74,7 µm (0,75 mM/ml) an und erreichte schließlich einen Wert von 79,8 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 92,7% in der Lösungsmittelkontrolle auf 31,8% (0,5 mM/ml), sank dann auf 19,8% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 14,6% in der 1 mM Phenothrinlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 14,6% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Phenothrinlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.2.4 Permethrin

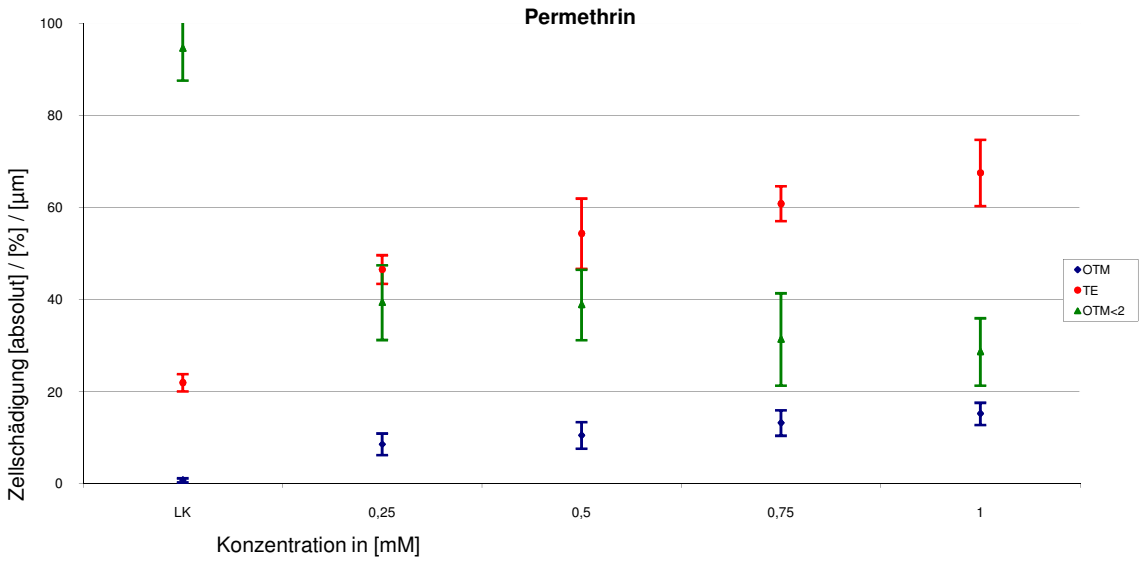

Abb 6: Permethrin
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 6 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Amitraz dargestellt. Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 23,4 µm.

Nach Inkubation mit Amitraz ergab sich folgendes:
In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 10,6. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 54,4 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung: Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,79 absolut auf 8,63 in der 0,25 mM

Konzentration, 10,56 in der 0,5 mM Konzentration, 13,25 in der 0,75 mM und schließlich auf 15,25 in der 1,0 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 22 µm auf 46,6 µm (0,25mM/ml), stieg dann auf 54,4(0,5 mM/ml), erreichte dann einen Wert von 60,9 µm (0,75 mM/ml) und stieg schließlich bis zu 67,6 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 94,6% in der Lösungsmittelkontrolle auf 39,4% (0,25mM/ml), sank dann auf 38,9% (0,5 mM/ml), nahm weiter ab bis zu einem Wert von 31,4%
(0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 28,7% in der 1 mM Permethrinlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 28,7% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Permethrinlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.2.5 Transfluthrin

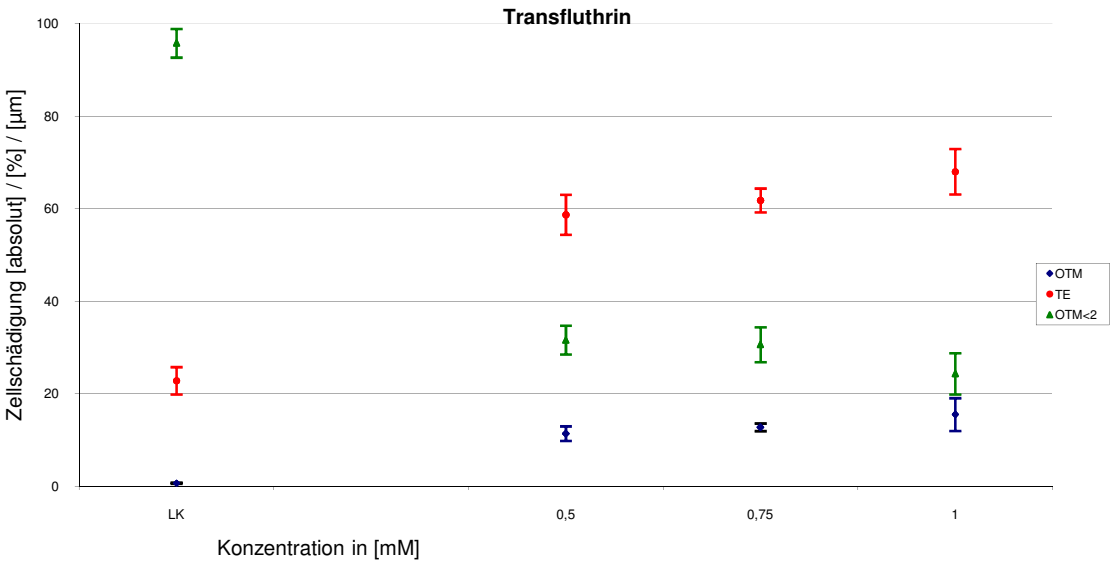

Abb 7: Transfluthrin
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Transfluthrin dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 22,8 µm.

Nach Inkubation mit Transfluthrin ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 11,36. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 58,7 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung: Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,66 absolut auf 11,36 in der 0,5 mM

Konzentration, 12,74 in der 0,75 mM und schließlich auf 15,49 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 22,8 µm auf 58,7 µm (0,5 mM/ml), stieg dann weiter auf 61,8 µm (0,75 mM/ml) und schließlich bis zu einem Wert von 68 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 95,8% in der Lösungsmittelkontrolle auf 31,6% (0,5 mM/ml), sank dann auf 30,6% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 24,3% in der 1 mM Transfluthrinlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 24,3% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Transfluthrinlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.3 Thiophosphonate

Aus der Gruppe der Thiophosphonate wurde in vorliegender Arbeit Diazinon getestet.

3.2.3.1 Diazinon

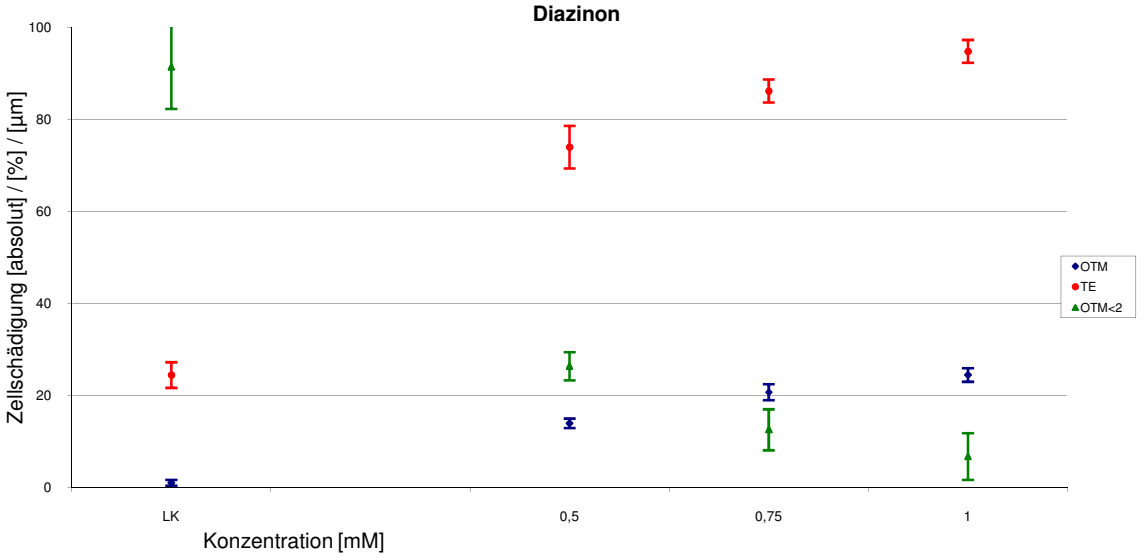

Abb 8: Diazinon
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Diazinon dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 24,5 µm.

Nach Inkubation mit Diazinon ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 14,02. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 74 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:

Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 1,06 absolut auf 14,02 in der 0,5 mM Konzentration, 20,79 in der 0,75 mM und schließlich auf 24,51 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 24,5 µm auf 74 µm (0,5 mM/ml), stieg dann auf 86,2 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 94,8 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 91,4% in der Lösungsmittelkontrolle auf 26,4% (0,5 mM/ml), sank dann auf 12,6% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 6,8% in der 1 mM Diazinonlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 6,8% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Diazinonlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.4 Glykolether

Piperonylbutoxid gehört in die Gruppe der Glykolether.

3.2.4.1 Piperonylbutoxid

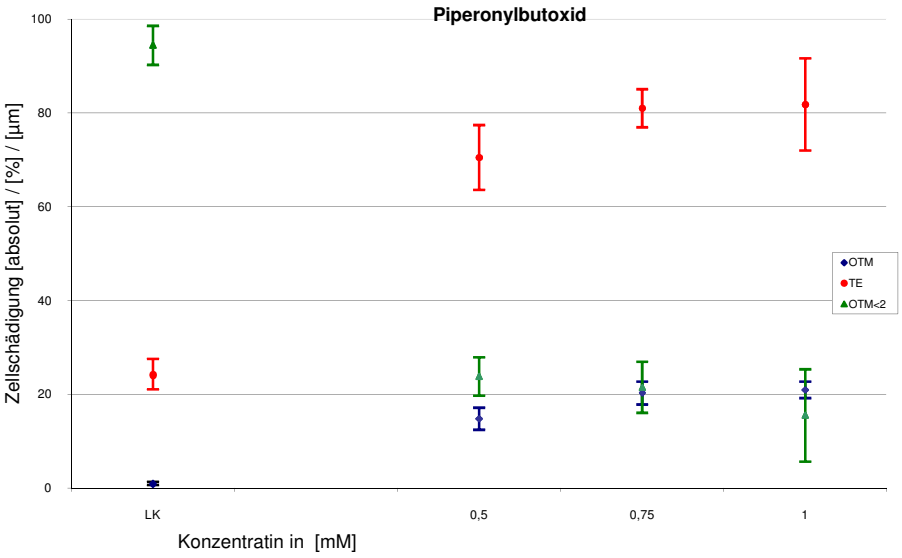

Abb 9: Piperonylbutoxid
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Piperonylbutoxid dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 24µm.

Nach Inkubation mit Piperonylbutoxid ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 14,8. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 70,5µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:

Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,75 absolut auf 14,8 in der 0,5 mM Konzentration, 20,28 in der 0,75 mM und schließlich auf 20,95 in der
1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 24 µm auf 70,5 µm (0,5 mM/ml), stieg dann auf 81 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 81,8 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 94,4% in der Lösungsmittelkontrolle auf 23,8% (0,5 mM/ml), sank dann auf 21,5% (0,75 mM/ml) und erreichte abschließend einen Wert von 15,5% in der 1 mM Piperonylbutoxidlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 15,5% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Pieronylbutoxidlösung, auf 85,3%
(0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der
1 mM Lösung.

3.2.5 Naturstoffe

Aus dieser Gruppe wurde Naturpyrethrum für den Versuch ausgewählt.

3.2.5.1 Naturpyrethrum

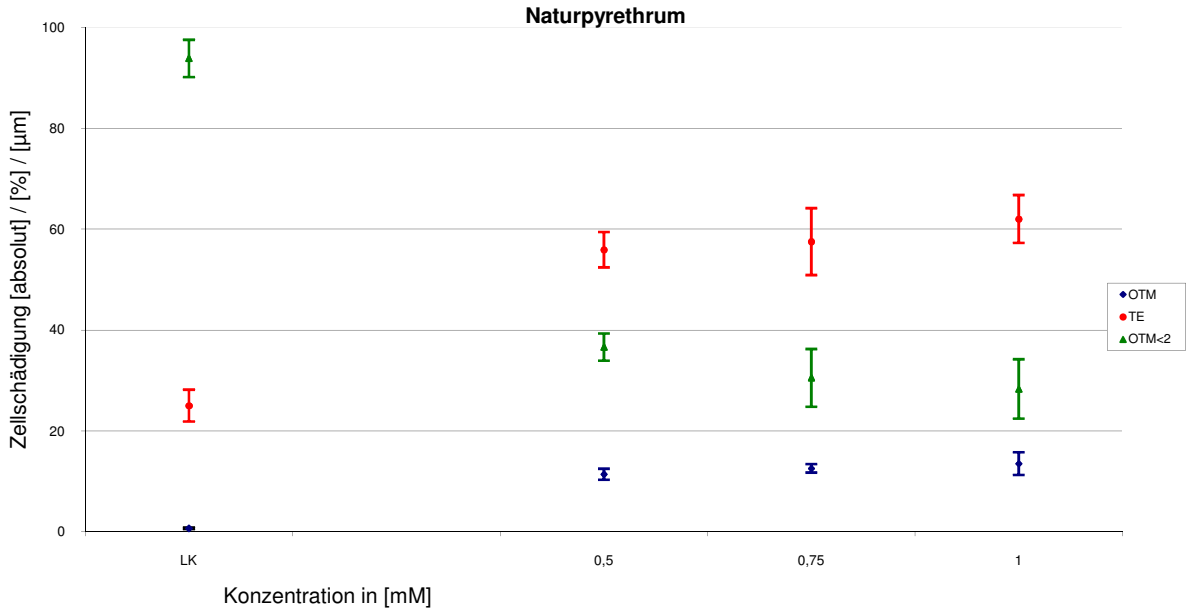

Abb 10: Naturpyrethrum
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Naturpyrethrum dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 25 µm.

Nach Inkubation mit Naturpyrethrum ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 11,4. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 55,9 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:
Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,7 absolut auf 11,4 in der 0,5 mM Konzentration, 12,58 in der 0,75 mM und schließlich auf 13,52 in der
1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 25 µm auf 55,9 µm (0,5 mM/ml), stieg dann auf 57,5 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 62 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 93,8% in der Lösungsmittelkontrolle auf 36,6% (0,5 mM/ml), sank dann auf 30,5% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 28,3% in der
1 mM Naturpyrethrumlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 28,3% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Naturpyrethrumlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.6 Cholinesterasehemmstoffe

Aus der Gruppe der Cholinesterasehemmstoffe wurde Malathion getestet.

3.2.6.1 Malathion

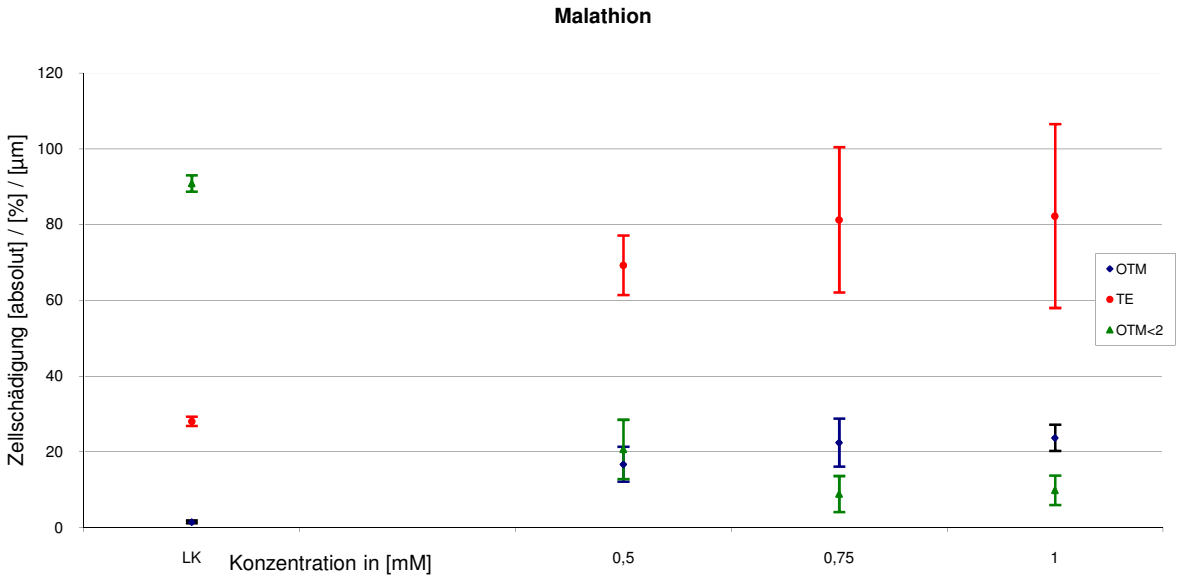

Abb 11: Malathion
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Malathion dargestellt.
Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 28µm.

Nach Inkubation mit Malathion ergab sich folgendes:
In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 16,66. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 69,2 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:
Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 1,43 absolut auf 16,66 in der 0,5 mM Konzentration, 22,4 in der 0,75 mM und schließlich auf 23,66 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 28 µm auf 69,2 µm (0,5 mM/ml), stieg dann auf 81,2 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 82,2 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 90,8% in der Lösungsmittelkontrolle auf 20,6% (0,5 mM/ml), sank dann auf 8,8% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 9,8% in der 1 mM Malathionlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 9,8% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Malathionlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.7 Acetylcholinesterasehemmstoff und Carbamate

Als Vertreter dieser Stoffgruppe wurde Pyridostigminbromid in diesem Versuch getestet.

3.2.7.1 Pyridostigminbromid

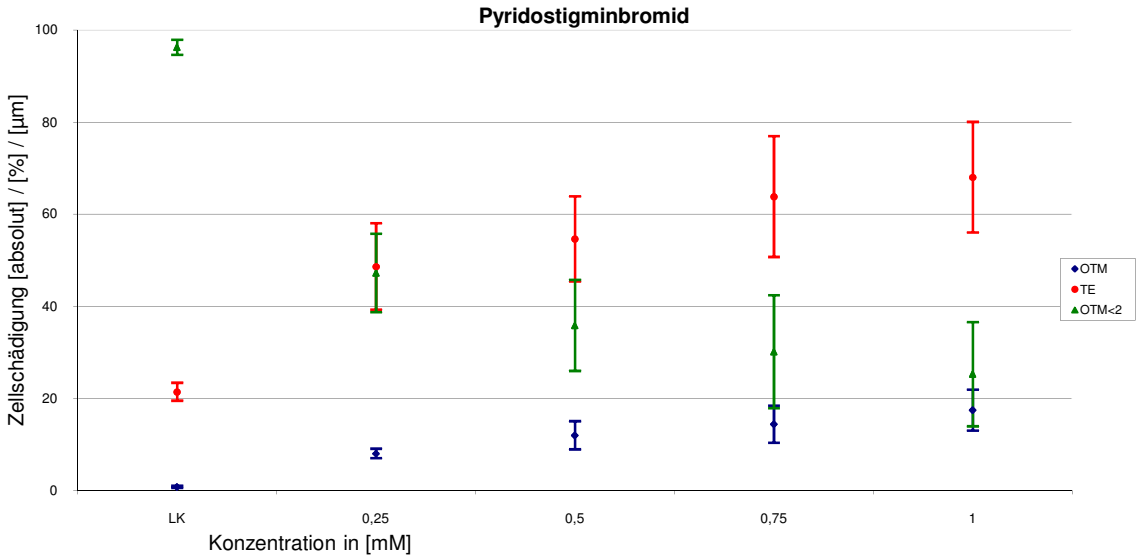

Abb 12: Pyridostigminbromid
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Pyridostigminbromid dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 21,4 µm.

Nach Inkubation mit Amitraz ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 11,94. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 54,6 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:
Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,74 absolut auf 7,99 in der 0,25 mM Konzentration, 11,94 in der 0,5 mM, 14,34 in der 0,75 mM und schließlich auf 17,4 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 21,4 µm auf 48,6 µm in der 0,25 mM Konzentration, stieg dann auf 54,6 µm (0,5 mM/ml), erfuhr eine nochmalige Steigerung auf 63,8 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 68 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 96,2% in der Lösungsmittelkontrolle auf 47,2% (0,25mM/ml), sank dann auf 35,8% (0,5 mM/ml), fiel weiter auf 30,1% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 25,2% in der 1 mM Pyridostigminbromidlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 25,2% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Pyridostigminbromidlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.8 Hemmung des GABA regulierten Chloridkanals

Aus dieser Substanzgruppe wurde Fipronil getestet.

3.2.8.1 Fipronil

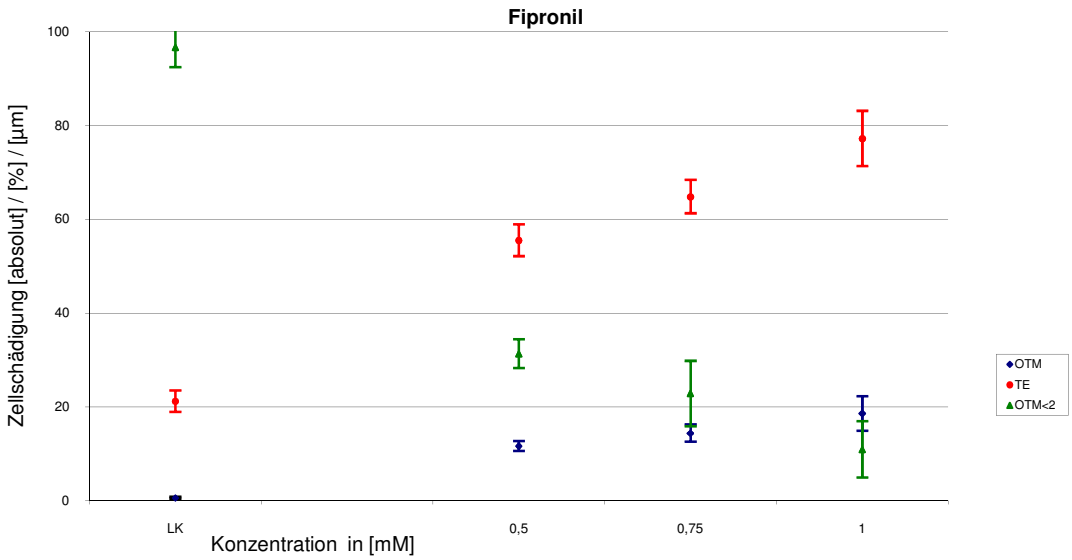

Abb 13: Fipronil
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Fipronil dargestellt. Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 21,2 µm.

Nach Inkubation mit Fipronil ergab sich folgendes:
In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 11,63. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 55,5 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:
Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,59 absolut auf 11,63 in der 0,5 mM Konzentration, 14,39 in der 0,75 mM und schließlich auf 18,57 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 21,2 µm auf 55,5 µm (0,5 mM/ml), stieg dann auf 64,8 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 77,2 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 96,6% in der Lösungsmittelkontrolle auf 31,3% (0,5 mM/ml), sank dann auf 22,8% (0,75 mM/ml) und erreichte abschließend einen Wert von 10,9% in der 1 mM Fipronillösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 10,9% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Fipronillösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.9 Silane

In diesem Versuch wurde aus der Gruppe der Silane Silafluophen getestet.

3.2.9.1 Silafluophen

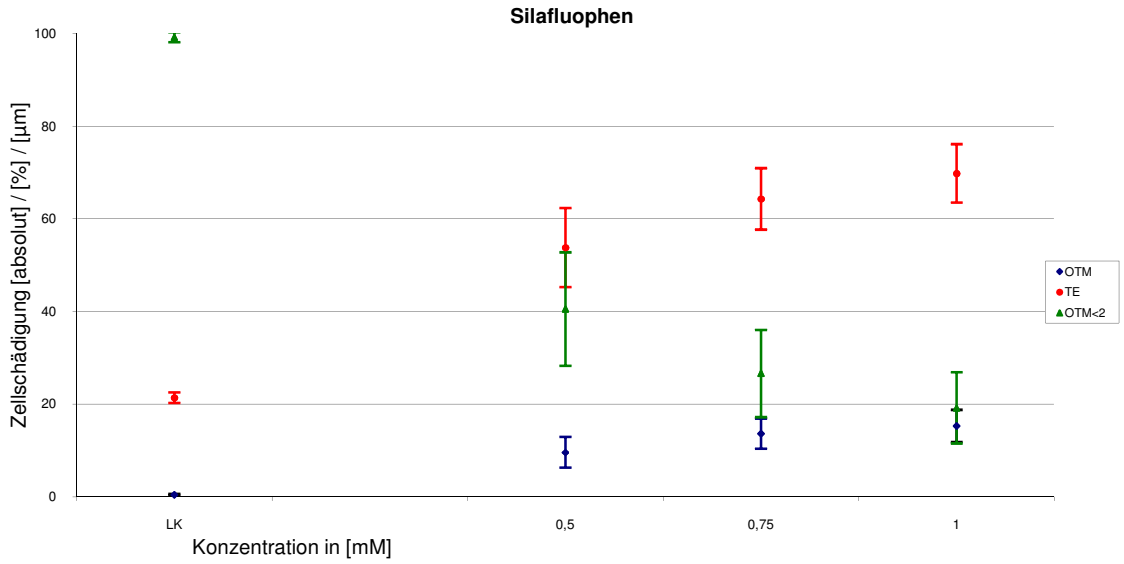

Abb 14: Silafluophen
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Silafluophen dargestellt.
Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 21,4 µm.

Nach Inkubation mit Malathion ergab sich folgendes:
In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 9,6. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 53,8 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:
Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,43 absolut auf 9,6 in der 0,5 mM Konzentration, 13,62 in der 0,75 mM und schließlich auf 15,28 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 21,4 µm auf 53,8 µm (0,5 mM/ml), stieg dann auf 64,3 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 69,8 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 99,2% in der Lösungsmittelkontrolle auf 40,5% (0,5 mM/ml), sank dann weiter auf 26,6% (0,75 mM/ml) und erreichte abschließend einen Wert von 19,2% in der 1 mM Silafluophenlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 19,2% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Silafluophenlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.10 Akarizide

Eine Untergruppe dieser Substanzgruppe sind die Pyrazoloximether, ein Vertreter ist Fenpyroximat, das im Versuch getestet wurde.

3.2.10.1 Fenpyroximate

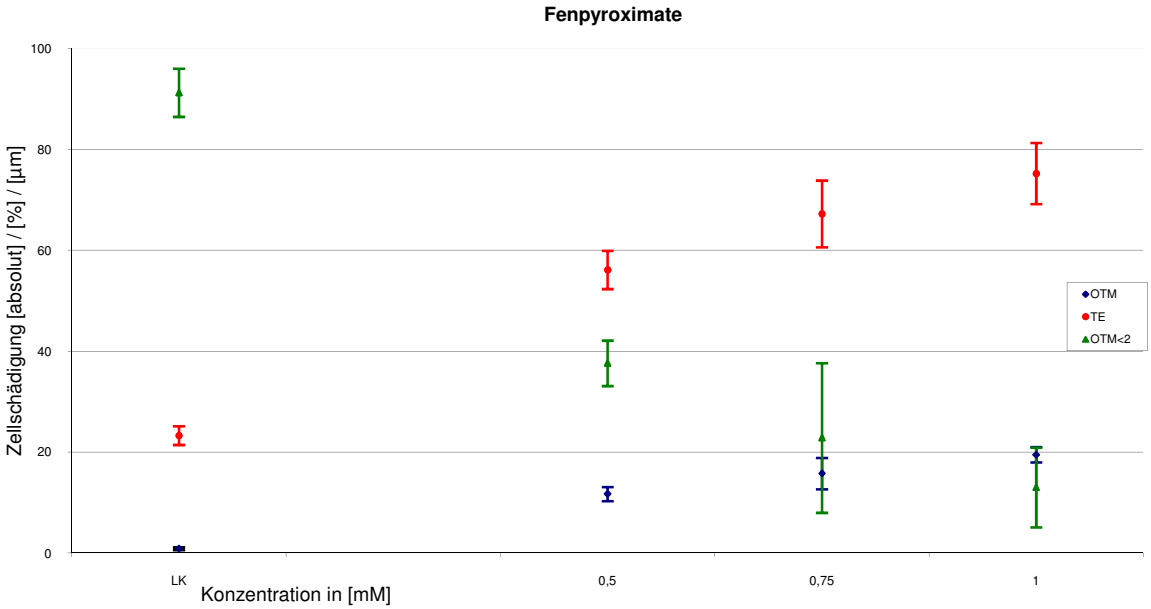

Abb 15: Fenpyroximate
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Fenpyroximate dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 23,3 µm.

Nach Inkubation mit Fenpyroximate ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 11,71. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 56,1 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:
Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,88 absolut auf 11,71 in der 0,5 mM Konzentration, 15,77 in der 0,75 mM und schließlich auf 19,5 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 23,3 µm auf 56,1 µm (0,5 mM/ml), stieg dann auf 67,2µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 75,2 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 91,2% in der Lösungsmittelkontrolle auf 37,6% (0,5 mM/ml), sank dann auf 22,8% (0,75 mM/ml) erreichte schließlich einen Wert von 13% in der 1 mM Malathionlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 13% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Fenpyroximatelösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.11 Insekten Repellentien

Diese große Stoffgruppe läßt sich chemisch in Ester und Amide einteilen. Für den Versuch wurden aus dieser Gruppe die Stoffe DEET, 3535 und Dimethylphthalat getestet.

3.2.11.1 DEET

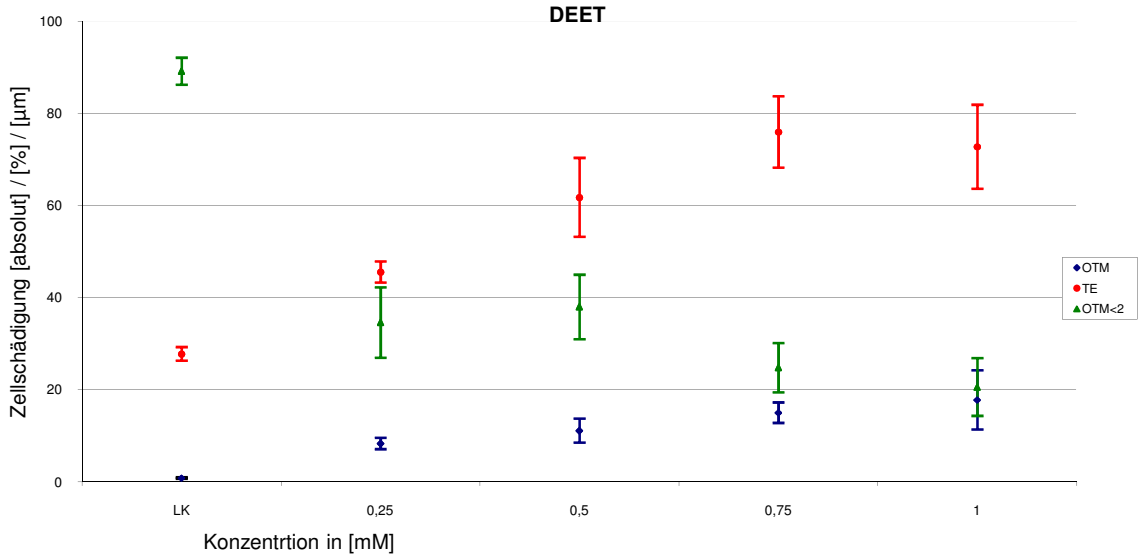

Abb 16: DEET
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Malathion dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 27,8 µm.

Nach Inkubation mit DEET ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 11,12. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 61,8 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:
Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,84 absolut auf 8,32 in der 0,25 mM Konzentration, 11,12 in der 0,5 mM Konzentration, 15,03 in der 0,75 mM und schließlich auf 17,82 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 27,8 µm auf 45,6 µm (0,25 mM/ml), stieg dann weiter auf 61,8 µm (0,5 mM/ml), erreichte dann einen Wert von 76 µm (0,75 mM/ml) und sank abschließend bis auf 72,8 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 89,2% in der Lösungsmittelkontrolle auf 34,6% (0,25 mM/ml), sank dann weiter auf 38% (0,5 mM/ml), fiel anschließend auf 24,8% (0,75 mM/ml) und erreichte dann einen Wert von 20,6% in der 1 mM DEET-Lösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 20,6% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM DEET-Lösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.11.2 3535

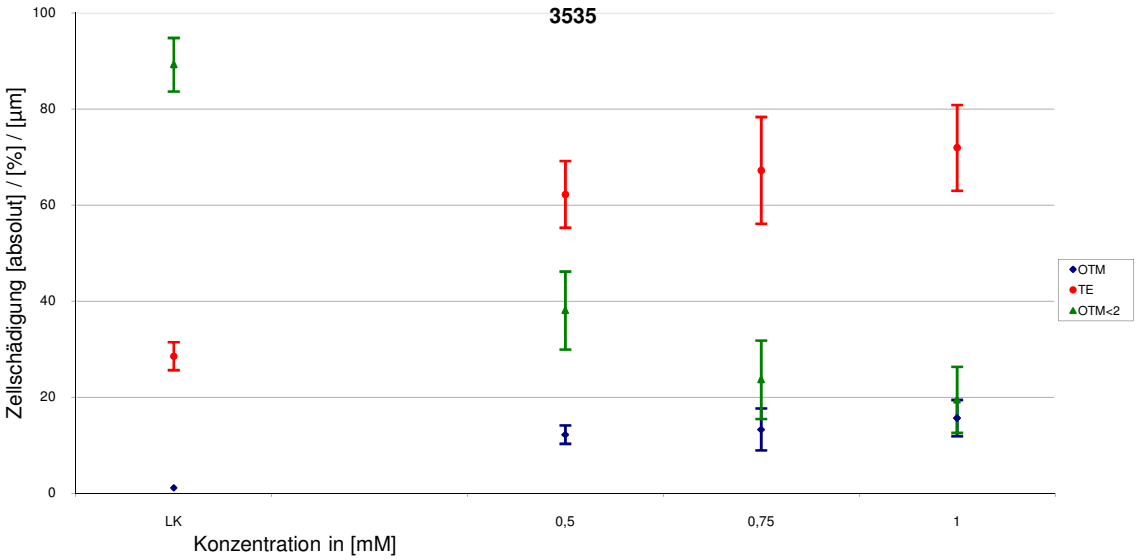

Abb 17: 3535
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit dem Insektizid 3535 dargestellt.
Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 28,5 µm.

Nach Inkubation mit 3535 ergab sich folgendes:
In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 12,16. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 62,2 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:

Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 1,09 absolut auf 12,16 in der 0,5 mM Konzentration, 13,24 in der 0,75 mM und schließlich auf 15,59 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 28,5 µm auf 62,2 µm (0,5 mM/ml), stieg dann weiter auf 67,2 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 71,9 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 89,2% in der Lösungsmittelkontrolle auf 38% (0,5 mM/ml), sank dann auf 23,6% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 19,4% in der 1 mM Lösung mit 3535. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 19,4% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Lösung mit dem Insektizid 3535, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.11.3 Dimethylphthalat

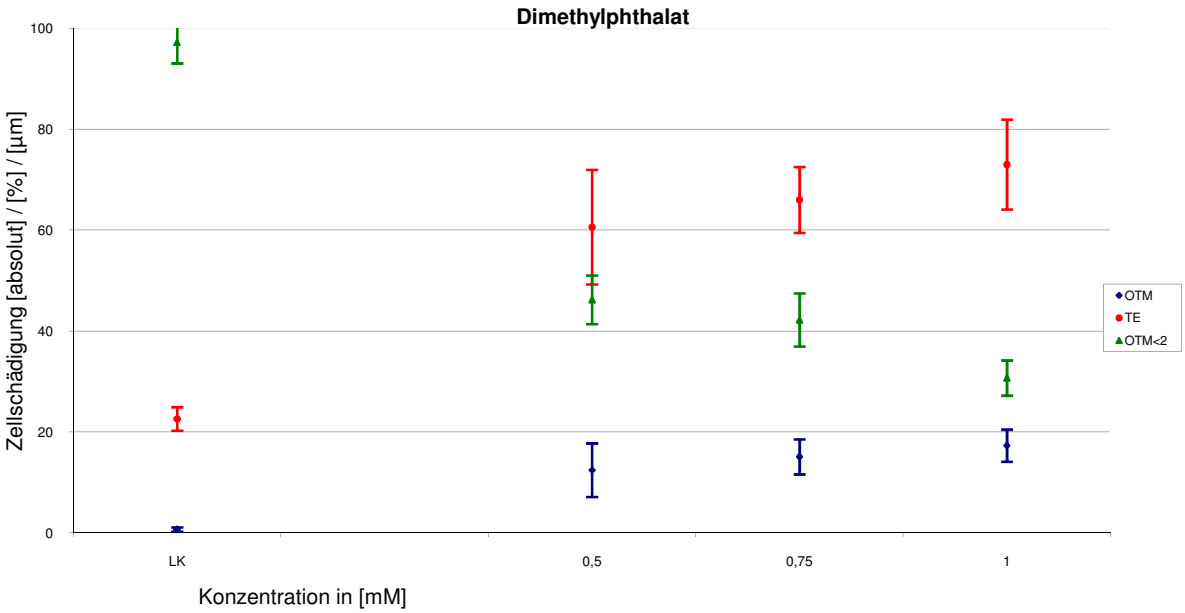

Abb 18: Dimethylphthalat
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Dimethylphthalat dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 22,6µm.

Nach Inkubation mit Dimethylphthalat ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 12,45. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 60,6 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:

Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,7 absolut auf 12,45 in der 0,5 mM Konzentration, 15,08 in der 0,75 mM und schließlich auf 17,3 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 22,6 µm auf 60,6 µm in der 0,5 mM Konzentration und von 66 µm in der 0,75 mM bis zu 73 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 97,2% in der Lösungsmittelkontrolle auf 46,2% (0,5 mM/ml), sank dann auf 42,2% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 30,7% in der 1 mM Dimethylphthalatlösung. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 30,7% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Dimethylphthalatlösung, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.12 Substanzkombinationen

Als Substanzkombinationen wurden im Versuch getestet:

DEET-Pyridostigminbromid
DEET-Permethrin
Pyridostigminbromid-Permethrin
DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin

Bei der Testung der Kombinationen wurden wie auch bei den Einzelsubstanzen DEET, Permethrin und Pyridostigminbromid jeweils zusätzlich die Werte der 0,25 mMolaren Konzentration bestimmt.

3.2.12.1 DEET-Pyridostigminbromid

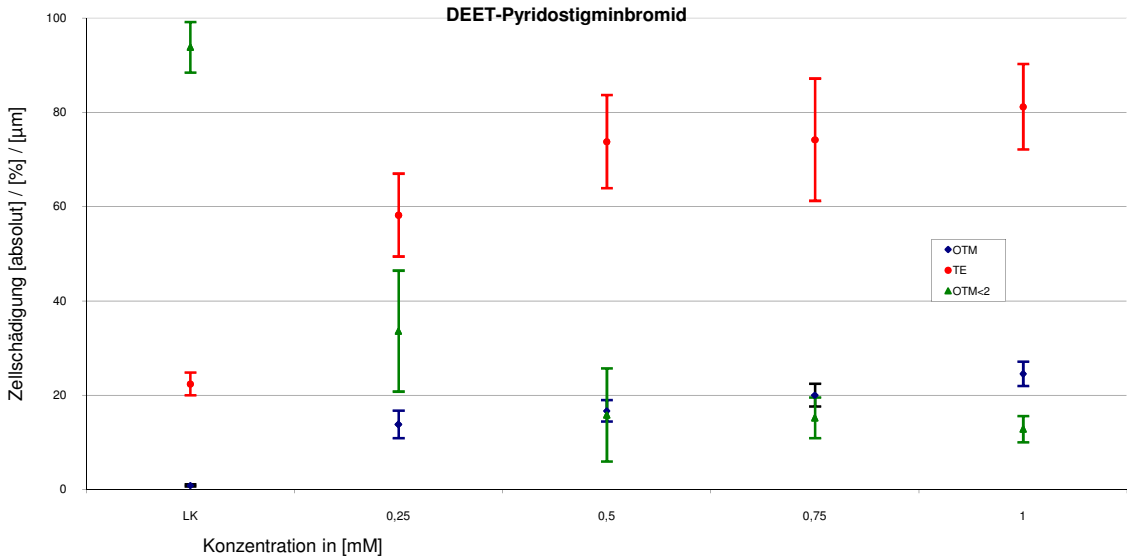

Abb 19: DEET-Pyridostigminbromid
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit der Kombination DEET-Pyridostigminbromid dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 22,4 µm.

Nach Inkubation mit der Kombination DEET-Pyridostigminbromid ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 16,7. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 73,8 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:
Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,88 absolut auf 13,81 in der 0,25 mM Konzentration, 16,7 in der 0,5 mM Konzentration, 20,04 in der 0,75 mM und schließlich auf 24,53 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 22,4 µm auf 58,2 µm (0,25 mM/ml), stieg dann weiter auf 73,8 µm (0,5 mM/ml), erfuhr einen weiteren Anstieg auf 74,2 µm (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 81,2 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 95,8% in der Lösungsmittelkontrolle auf 33,6% (0,25 mM/ml), sank weiter auf 15,8% (0,5 mM/ml), fiel anschließend auf 15,2% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 12,8% in der 1 mM Lösung der Kombination DEET-Pyridostigminbromid. Dies bedeutet, dass in der 1 mMolaren Lösung lediglich 12,8% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Lösung der Kombination
DEET-Pyridostigminbromid, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.12.2 DEET-Permethrin

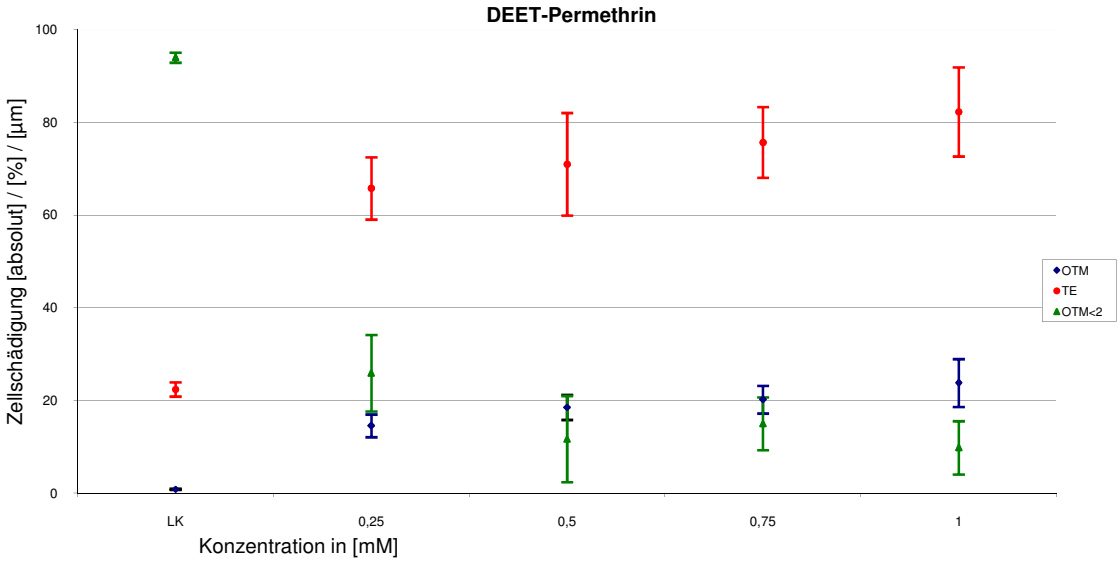

Abb 20: DEET-Permethrin
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit der Kombination DEET-Permethrin dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 22,4 µm.

Nach Inkubation mit der Kombination DEET-Permethrin ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 18,53. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 71 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:

Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,85 absolut auf 14,54 in der 0,25 mM Konzentration, 18,53 in der 0,5 mM Konzentration, 20,2 in der 0,75 mM und schließlich auf 23,8 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 22,4 µm auf 65,8 µm (0,25 mM/ml), stieg dann auf 71 µm (0,5 mM/ml), erreichte dann 75,7 µm (0,75 mM/ml) und stieg dann nochmals bis zu einem Wert von 82,3 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 94% in der Lösungsmittelkontrolle auf 25,9% (0,25 mM/ml), fiel dann auf 11,7% (0,5 mM/ml), stieg dann wieder auf 15% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 9,8% in der 1 mM Lösung der Kombination DEET-Permethrin. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 9,8% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Lösung der Kombination DEET-Permethrin, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.12.3 Pyridostigminbromid-Permethrin

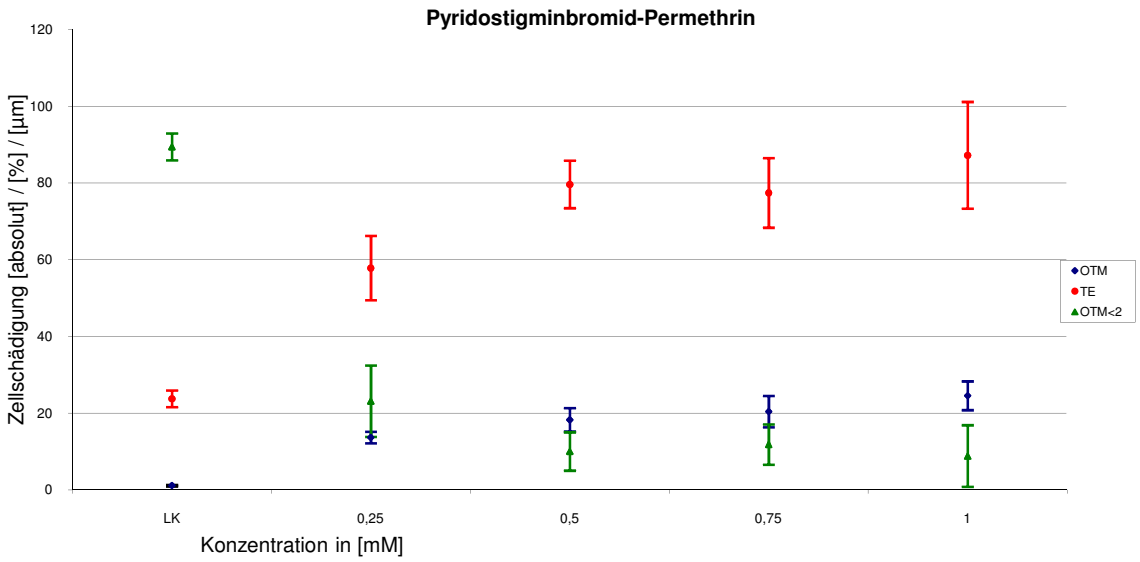

Abb 21: Pyridostigminbromid-Permethrin
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit der Kombination Pyridostigminbromid-Permethrin dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 23,7 µm.

Nach Inkubation mit der Kombination Pyridostigminbromid-Permethrin ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 18,24. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 79,6 µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:

Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 1,1 absolut auf 13,62 in der 0,25 mM Konzentration, 18,24 in der 0,5 mM Konzentration, 20,38 in der 0,75 mM und schließlich auf 24,52 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 23,7 µm auf 57,8 µm (0,25 mM/ml), stieg dann auf 79,6 µm (0,5 mM/ml), sank dann geringfügig auf 77,4 µm (0,75 mM/ml) und stieg dann nochmals auf einen Wert von 87,2 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 89,4% in der Lösungsmittelkontrolle auf 23,1% (0,25 mM/ml), sank dann weiter auf 10% (0,5 mM/ml), stieg dann geringfügig an auf 11,8% (0,75 mM/ml) und fiel dann erneut bis auf einem Wert von 8,8% in der 1 mM Lösung der Kombination Pyridostigminbromid-Permethrin. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 8,8% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Lösung der Kombination Pyridostigminbromid-Permethrin, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

3.2.12.4 DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin

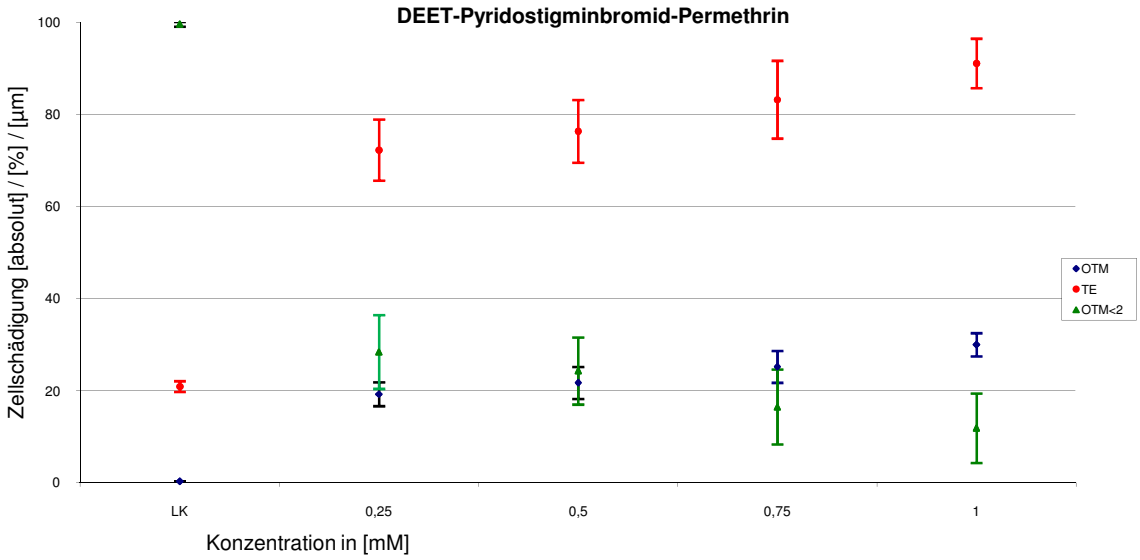

Abb 22: DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin
Ergebnisse der Versuchsreihe für Lösungsmittelkontrolle (LK) und die jeweilige Substanzkonzentration in µmol/ml Zellsuspension. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der erfaßten Daten mit einem Fehlerindikator von +/- 1 Standardabweichung.
TE: Tail extent in µm
OTM: Olive Tail Moment absolut
OTM<2: Olive Tail Moment als Prozentwert der Gesamtmessung

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit der Kombination DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin dargestellt.

Zu Versuchsbeginn lag die Zellvitalität (OTM<2) bei 97,2%, die mittlere DNS Wanderungsstrecke (TE) betrug 20,94 µm.

Nach Inkubation mit der Kombination DEET-Pyridostigminbromid ergab sich folgendes:

In einer Konzentration von 0,5 mM/ml betrug die Zellvitalität noch 89,6%. Es konnte also von einer zu vernachlässigenden Schädigung der DNS der Zellen ausgegangen werden. Das OTM als Genotoxizitätsindikator betrug im Mittel 21,72. Dabei lag die durchschnittliche Migrationsstrecke bei 76,37µm.

Mit ansteigender Konzentration fand sich auch eine Zunahme der DNS-Schädigung:

Das Olive Tail Moment stieg von einer Ausgangskonzentration in der Lösungsmittelkontrolle mit 0,32 absolut auf 19,27 in der 0,25 mM Konzentration, 21,72 in der 0,5 mM Konzentration, 25,22 in der 0,75 mM und schließlich auf 30,01 in der 1 mM Lösung.

Das Tail Extent, d.h. die Migrationslänge der Kometen, erfuhr eine Steigerung von 20,94 µm auf 72,31 µm (0,25 mM/ml), stieg dann weiter auf 76,37 µm (0,5 mM/ml), erreichte dann einen Wert von 83,25 µm (0,75 mM/ml) stieg dann nochmals bis zu einem Wert von 91,12 µm in der 1 mM Konzentration.

Der Wert des OTM<2 fiel mit steigender Substanzkonzentration linear von 99,62% in der Lösungsmittelkontrolle auf 28,4% (0,25 mM/ml), sank dann weiter auf 24,31% (0,5 mM/ml), fiel dann auf 16,5% (0,75 mM/ml) und erreichte schließlich einen Wert von 11,87% in der 1 mM Lösung der Kombination DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin. Dies bedeutet, dass in der 1 mM Lösung lediglich 11,87% der Zellen noch ungeschädigt waren.

Die Zellvitalität sank bei einem Ausgangswert von 97,2 % auf 89,6% nach Inkubation mit der 0,5 mM Lösung der Kombination
DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin, auf 85,3% (0,75 mM/ml) bis zu einem Wert von 82,4% nach Inkubation mit der 1 mM Lösung.

4 Diskussion

Substanzen, mit denen Menschen täglich umgehen, stellen oft eine mehr oder weniger große Gefährdung für deren Gesundheit dar, die meist zum aktuellen Zeitpunkt nicht einschätzbar ist.
So wurden in Hausstaub z.B. Rückstände von Permethrin festgestellt, das in Holzschutzmitteln, zur Imprägnierung von Möbeln und auch Teppichen eingesetzt wird.
In unserem Versuch konnte schon bei geringen Substanzkonzentrationen eine Genotoxizität an humanen Lymphozyten nachgewiesen werden. Was das für gesundheitliche Auswirkungen hat und was die Folgen sind, ist derzeit noch unklar [92, 111, 112, 113, 114, 115].

Die vorliegende experimentelle Studie behandelt die genotoxische Wirkung von Insektiziden und Pestiziden, sowie einigen Kombinationspräparaten an humanen Lymphozyten mittels der alkalischen Form der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese.

4.1 Mikrogelelekrophorese (Comet Assay)

Die DNS wird bei diesem Verfahren bereits unmittelbar denaturiert, die Doppelstranghelix aufgelöst und außerdem entdrillt, was eine entscheidende Voraussetzung der Wanderung zur Anode im elektrischen Feld der Elektrophorese darstellt [37] und auf diese Weise auch den Nachweis von Einzelstrangbrüchen ermöglicht [27].

Zusätzlich wird durch dieses Verfahren 95% der Zell-RNS abgebaut und so ein störendes Hintergrundsignal bei der Auswertung verhindert.

Die Anwendung von computergesteuerten Bildverarbeitungssystemen in Kombination mit phototechnischen Auswertmethoden schuf schließlich eine solide Basis für wissenschaftliches Arbeiten [37, 120] mit der Methode und ermöglichte einen objektiven, standardisierten Informationsaustausch.

Zum besseren Verständnis der Methode sei auf den Aufbau der DNS hingewiesen, der sich in Primär- und Sekundärstruktur gliedert, wobei die Primärstruktur der Basenpaarung, die Sekundärstruktur der Doppelhelix entspricht. Diese Doppelhelix ist um eine Kette aus Kernproteinen (Histonen) gewunden und liegt so als Superhelix vor.
Der DNS-Aufbau erklärt auch das Migrationsverhalten im elektrischen Feld.
Liegen Einzelstrangbrüche vor, kommt es lediglich zu einer Auflockerung der DNS Struktur mit Ausbildung sog. Loops (Schleifen). Diese wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode [26, 37].
Der alkalische pH-Wert führt dabei zu einer Unterbrechung der Basenpaarung und macht so Einzelstrangbrüche und akali-labile Stellen sichtbar [109, 120, 135].

Dabei wandern einzelne DNS-Fragmente, nachdem sie sich vom Chromatinfaden gelöst haben, ihrer Länge entsprechend im Agarosegel [67, 96], wobei die Anzahl der induzierten DNS-Strangbrüche und die Migrationsstrecke der Fragmente sich proportional zueinander verhalten [72].

Der alkalische pH-Wert ermöglicht außerdem eine wesentlich höhere Migration von DNS aus dem Zellkern (bis zu 90%). Unter neutralen Versuchsbedingungen liegt dieser bei maximal 20%. Der alkalische pH-Wert erzielt damit eine wesentlich höhere Sensitivität und ein größeres Auflösungsvermögen [27].

Insgesamt stellt der Comet Assay im Vergleich mit anderen anerkannten Versuchsmethoden wie der Sister Chromatin-Exchange, der Alkaline Elution Methode, der DNS unwinding technique oder dem Micronucleus-Test eine äußerst sensitive, einfache und preiswerte Methode zum Nachweis von DNS-Schäden dar [12, 128].

Dennoch gibt es kritische Meinungen diese Methodik zum Nachweis von DNS Schäden zu nutzen, da nach Ansicht einiger Autoren bereits physiologische Reparaturvorgänge im Zellkern Kometenbildung auslösen können [19, 26, 37, 44] und diese dann fälschlicherweise als positiv gewertet werden.

Viele dieser Zellreparaturvorgänge verlaufen jedoch fehlerfrei und führen nicht zu einer Mutation des Zellgenoms [131, 132].

Gegenteiliges fanden Martin et al. heraus, die eine signifikante Kometenformation an humanen MCL-5 Zellen in Anwesenheit eines DNS-Reparaturinhibitors nachweisen konnten [82], und auch Helbig und Speit zeigten in ihrer Studie eine DNS-Schädigung durch die Mikrogelelektrophorese an V79 Hamsterzellen, denen das DNS Reparaturgen fehlte [54, 132].

Bei allen Testreihen unserer Versuche erfolgte parallel zur Testung der Lymphozyten an den verschiedenen Substanzen eine Leerkontrolle mit dem verwendeteten Lösungsmittel DMSO. Dies ermöglichte zum einen die Erfassung spontaner DNS-Defekte und gleichzeitig die Testung des Lösungsmittels auf eine mögliche Genotoxizität. Darüber hinaus ließ sich anhand dieser Werte auch eine Aussage über eine mögliche interindividuelle Schadstoffbelastungen der Versuchspersonen treffen.

Für jede Zellprobe wurde außerdem ein Vitalitätstest nach Phillips durchgeführt [103]. Die relative Vitalität (bezogen auf die Ausgangsvitalität) lag dabei durchgängig bei mehr als 90%.

Zu stark geschädigte Proben (Vitalität<90%) wurden verworfen und nicht in die Versuchsreihe eingesteuert, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine zu hohe vorbestehende Schädigung (z.B. Fehler bei der Aufbereitung) der Zellen zu vermeiden und die Objektivität der Daten zu gewährleisten. Es wurden nur Proben mit einer Mindestvitälität von 90% in die Versuchsreihe aufgenommen.

Die Methode der Mikrogelelektrophorese ermöglicht, wie schon erwähnt, den direkten Nachweis von DNS-Brüchen proportional zur jeweiligen Zellschädigung und den damit verbundenen Regenerationsvorgängen [67,109].

Für die Auswertung der Ergebnisse stehen verschiedene Parameter zur Verfügung. Damit ist auch ein Vergleich zwischen verschiedenen Studien möglich. Wir bestimmten für unsere Auswertung die Kometenlänge. Wichtig hierbei ist, zu definieren, von welcher Stelle aus der Kometenschweif gemessen wird: Die Messung kann vom Anfang [121], vom Zentrum [97] oder vom Ende des Kometen Kopfes [5] erfolgen.

In unseren Testreihen verglichen wird das Tail Extent (definiert als Schweiflänge in μm), das sogenannte Olive Tail Moment, d.h. das Verhältnis des DNS-Anteils im Kometenkopf zu dem DNS-Anteil im Kometenschweif [99] (berücksichtigt wird hier auch die Leuchtintensität an Kopf und Schweif) und das OTM<2, definiert als Anteil der nicht oder nur gering geschädigten Zellen.
Die Messwerte der Lösungsmittelkontrollen der Lymphozyten lagen im Bereich 21μm und 28μm. Vergleichbare Werte sind in anderen Studien vorbeschrieben [12].

4.1.1 Mögliche Fehlerquellen in der Versuchsdurchführung

Bei Anwendung des Comet Assay bzw. bei der Auswertung der Testreihen traten bisweilen Probleme auf, denen oft folgende Fehler zugrunde lagen:

Problem 1:

Unter dem Mikroskop erscheint die Agaroseschicht kristallisiert, es liegt keine homogene Schichtung der Agarose vor. Dies erschwert die Einstellung der Kometen im Mikroskop, da sich die Zellen in unterschiedlichen Ebenen auf dem Objektträger befinden, und macht auf diese Weise Fehlmessungen durch den Computer wahrscheinlich.

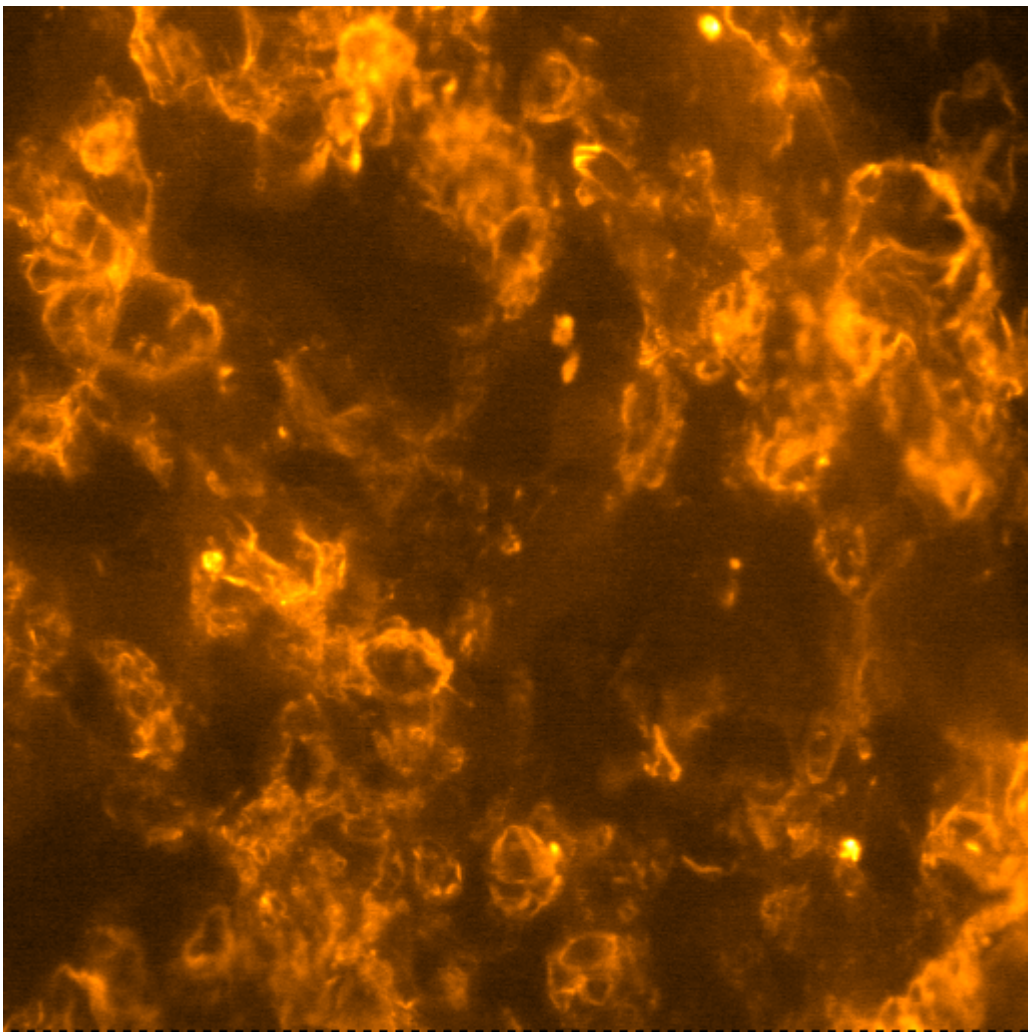

Abb 23: Ungleichmäßig aufgetragene Agarose unter dem Fluoreszenzmikroskop (20-fache Vergrößerung)

Erklärung:

Die aufzubringende Agarose sollte ausreichend gelöst sein, darüber hinaus sollte ein möglichst gleichmäßiges Auftragen der Agaroseschichten erfolgen. Dies wird durch zügiges Aufpipettieren und abschließende Aushärtung der Objektträger in einer feuchten Kammer im Kühlschrank erreicht. Die Aufbewahrung in dieser Kammer erfolgt bis zur Aufbringung der Zellen auf die Objektträger.

Problem 2:

Unter dem Mikroskop erscheinen stark fluoreszierende Kristalle.

Erklärung:

Gröbere Festbestandteile des Ethidiumbromids sind durch ungenaues Abfiltrieren oder defekten Filter in die Färbelösung gelangt. Der Objektträger ist nicht auswertbar und muß verworfen werden, Fehlmessungen, die die Ergebnisse verfälschen würden, wären somit nicht zu vermeiden.

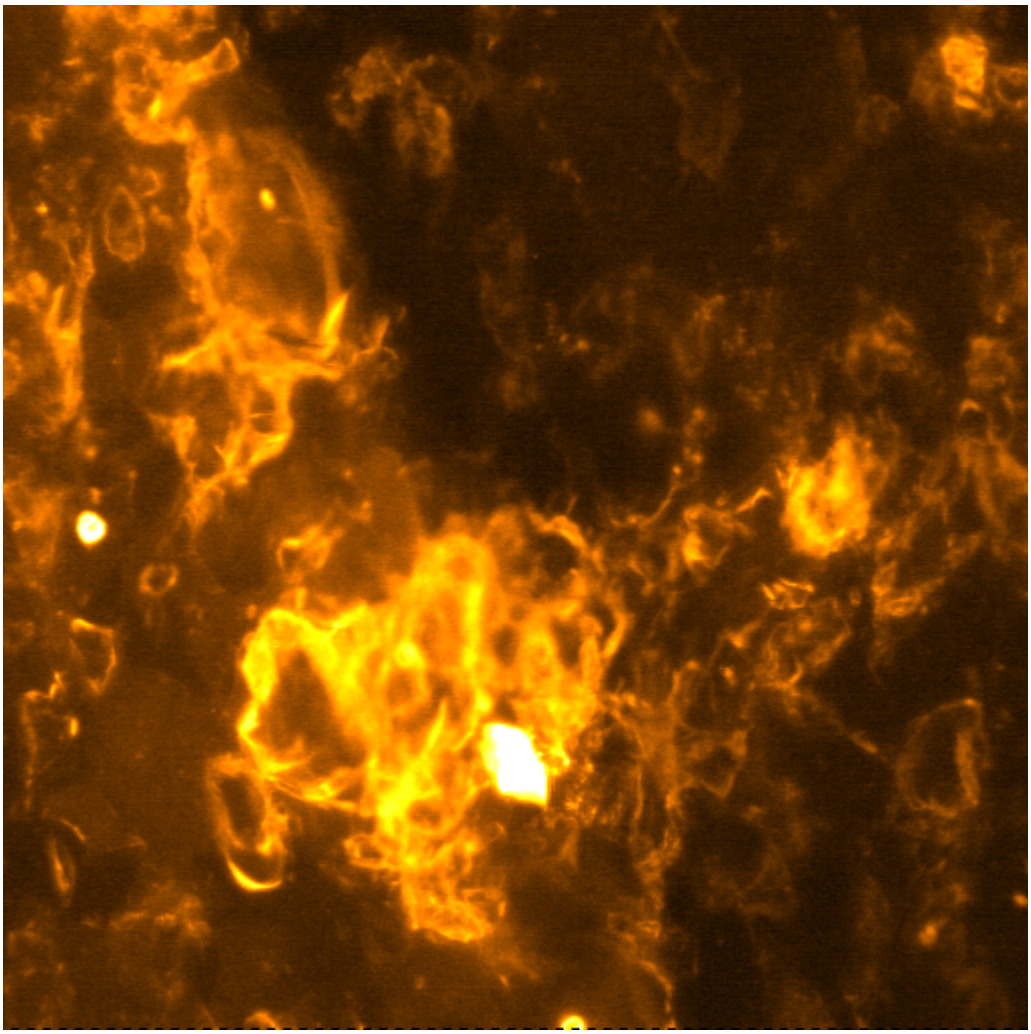

Abb 24: Ethidiumbromidkristalle unter dem Fluoreszenzmikroskop (20-fache Vergrößerung)

Problem 3:

Kometen verlaufen in unterschiedliche/in die entgegengesetzte Richtung/en.

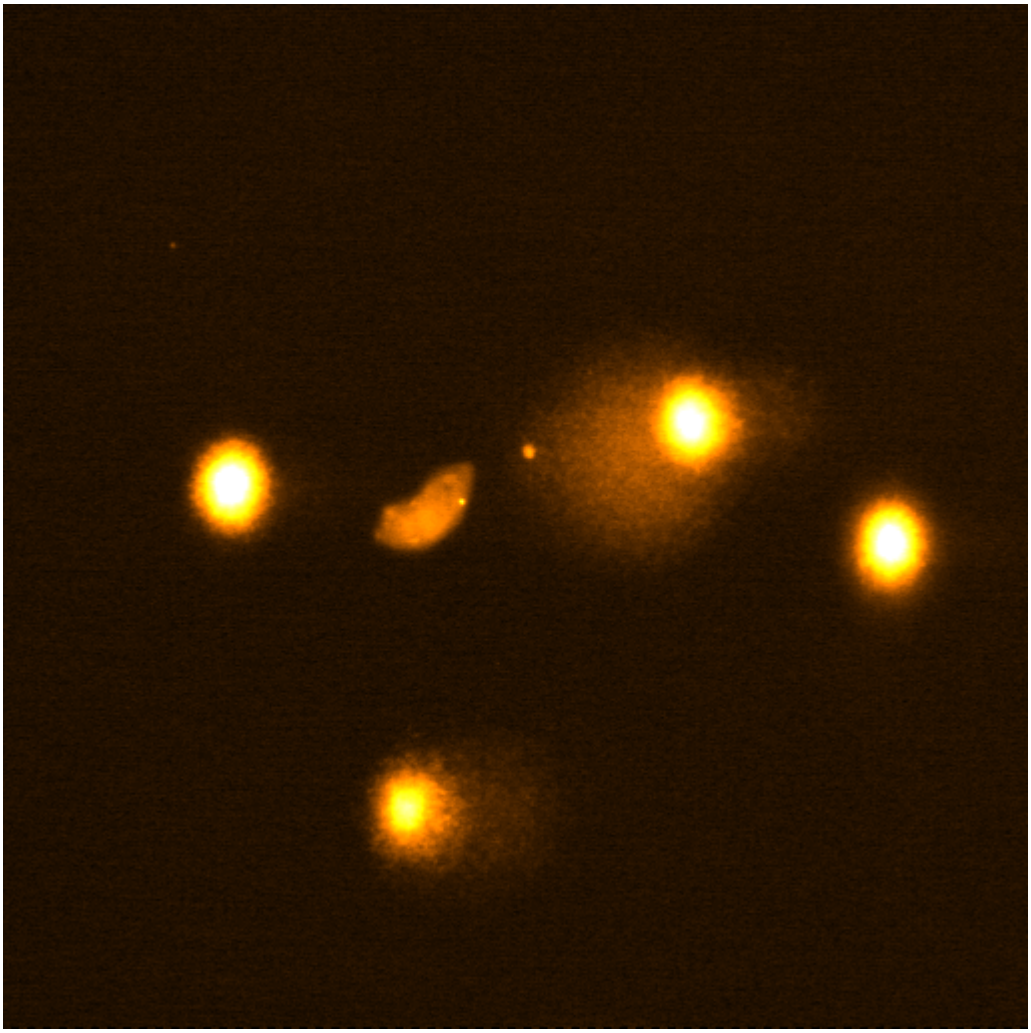

Abb 25: Entgegengesetzter Kometenverlauf unter dem Fluoreszenzmikroskop (20-fache Vergrößerung)

Erklärung:

Möglicherweise lag der Objektträger in der Elektrophoresewanne nicht waagerecht zum Stromverlauf bzw (bei entgegengesetzter Richtung) lag der Objektträger mit der Nummerierung in der entgegengesetzten Richtung.

Ähnliches Problem: Kometen zeigen in falsche Richtung

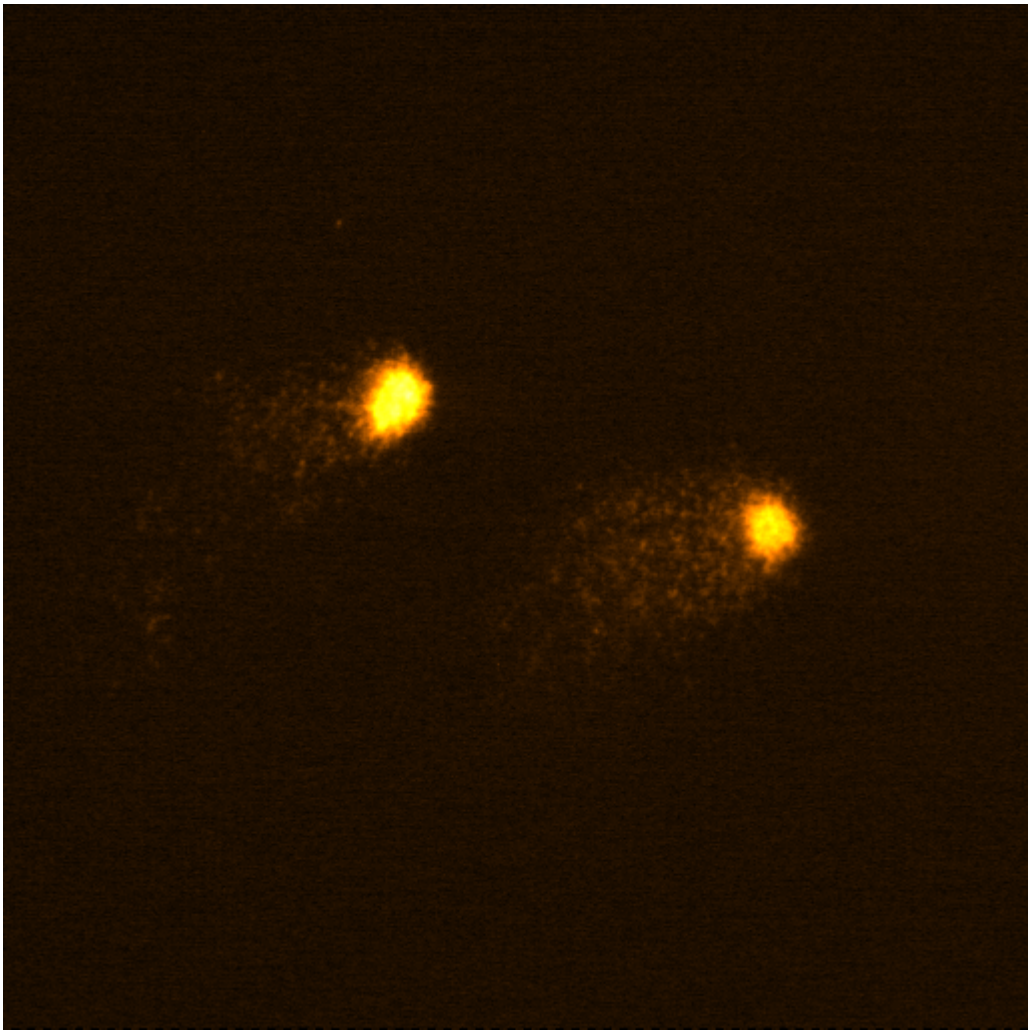

Abb 26: Entgegengesetzter Kometenverlauf unter dem Fluoreszenzmikroskop (20-fache Vergrößerung)

Erklärung: Objektträger liegt in falscher Richtung unter dem Mikroskop. Auswertung wird so fehlerhaft.

Problem 4:

In der Lösungsmittelkontrolle treten vermehrt tote Zellen auf. Die Lösungsmittelkontrolle dient der Bestimmung der Vitalität der Probe ohne Zugabe einer genotoxischen Substanz.

Erklärung:

Bei diesem Problem sind zahlreiche Fehlerquellen möglich. Daher sollte die Kontrolle des Vitalitätstests(auch im Vergleich zu den Toxizitätstesten) erfolgen: Lagen schon im Vitalitätstest vermehrt tote Zellen vor, ist der Fehler in der Lymphozytenaufbereitung bzw. bei Auftauen und Wiedergewinnen zu suchen. Möglich ist jedoch auch, dass eine Probe natürlicherweise vermehrt geschädigte Zellen aufweist.

Ist der Vitalitätstest unauffällig liegt der Fehler möglicherweise in einer mechanischen Zellschädigung (Deckglas aufsetzen, pipettieren etc.) oder in einer zu langsamen Verarbeitung des Probenmaterials nach Gewinnung oder einer Schädigung durch UV-Strahlen, wenn bei den entscheidenden Arbeitsschritten nicht unter Rotlicht gearbeitet wurde.

Problem 5:

Beim Einfüllen der Lyselösung in die Färbeküvetten, beim Einfüllen des Elektrophoresepuffers in die Elektrophoresewanne bzw. beim Spülen der Objektträger mit Neutralisationslösung lösen sich die Agaroseschichten ab.

Erklärung:

Die Agarose war ungenau abgewogen, nicht vollständig gelöst oder die Ausgangsstoffe zu alt (Haltbarkeitsdatum), dies alles führt zu einer falschen Zusammensetzung der Lösung und einer schlechten Haftung auf den Objektträgern.

Problem 6:

In der Agaroseschicht finden sich Risse/Falten.

Erklärung:

Zu hohe Temperatur der gelösten Agarose bzw. zu geringe Umgebungsluftfeuchtigkeit beim Aushärten verursachen Risse in der Agaroseschicht. Es sollte auf eine angemessene Temperatur der gelösten Agarose geachtet werden. Nach Vorbereitung der Objektträger mit der gelösten Agarose sollten diese bis zum Aufbringen der Zellen in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Problem 7:

Zellen erscheinen unter dem Mikroskop nur schwach gefärbt.

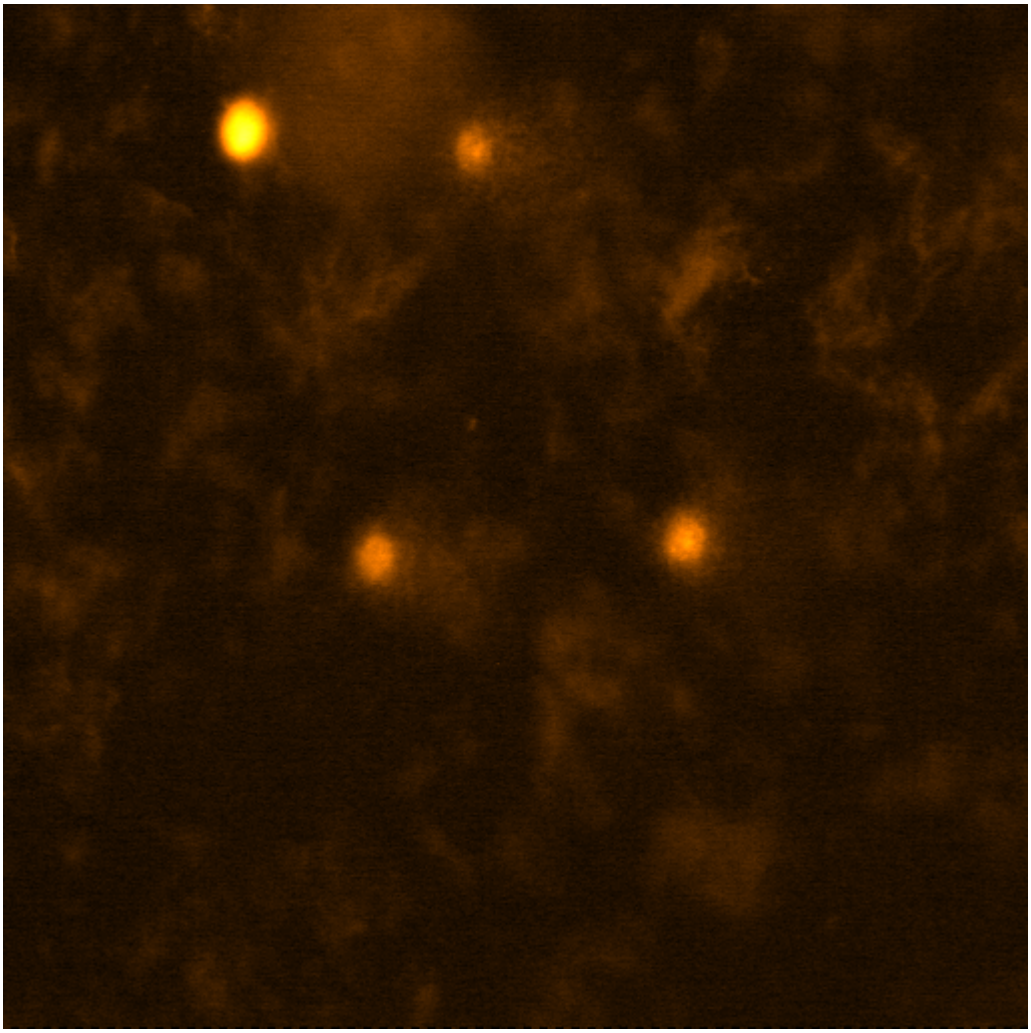

Abb 27: Zu schwach gefärbte Lymphozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop (20-fache Vergrößerung)

Erklärung:

Die Ethidiumbromidlösung war möglicherweise zu alt.

Eine andere Ursache könnte eine zu kurze Neutralisation der Objektträger nach der Elektrophorese sein. Die DNS liegt dann nicht in ihrer ursprünglichen Form vor und verhindert die Einlagerung von Ethidiumbromid in die Doppelhelix.

Problem 8:

Zellen liegen insgesamt zu dicht.

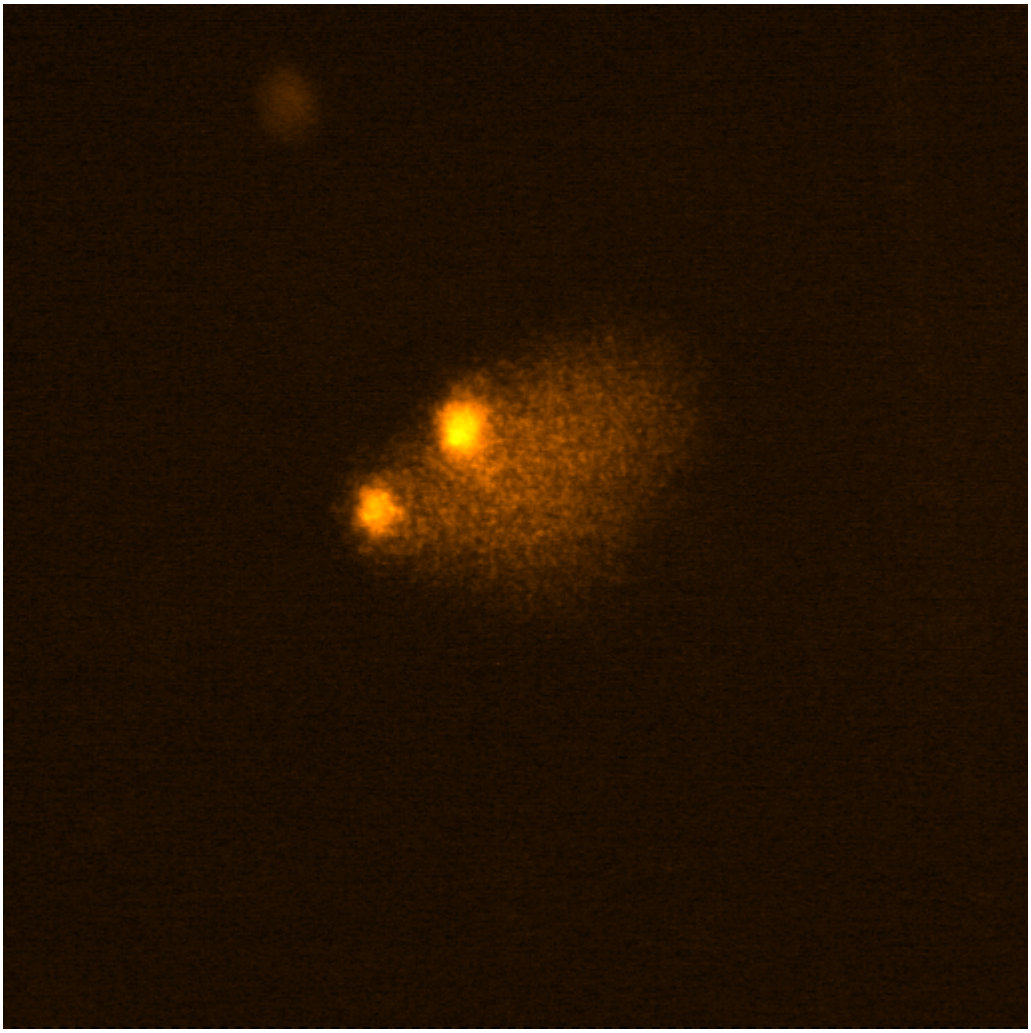

Abb 28: Zu dicht liegende Zellen (20-fache Vergrößerung)

Erklärung:

Das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation nicht ausreichend resuspendiert. Die Zellen kamen so in der Agaroseschicht zu dicht zu liegen. Eine Auswertung und Abmessung der einzelnen Zellen bzw. deren Kometen ist so nicht möglich.

4.2 Substanzgruppen/Substanzen

Wir verwendeten insgesamt 21 Substanzen und 4 Kombinationen, die im Folgenden diskutiert werden.

4.2.1 Exposition humaner Lymphozyten mit Amitraz (Gruppe Triazapentadien)

Aus der Stoffgruppen der Akarizide, hier Gruppe der Triazapentadien, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirksubstanz Amitraz untersucht.

Amitraz (N-Methylbis(2,4-xylyliminomethyl)amin), das in der Landwirtschaft als Kontaktakarizid und –insektizid gegen Spinnmilben und Birnenblattsauger angewandt wird, ist chemisch ein α2-Adrenozeptoragonist. Die klinischen Effekte bei einer Intoxikation sind Bradykardie, Hypotension, Hyperglykämie, Miosis, Hypothermie, Polyurie und Erbrechen [16].

In der Literatur sind nur wenige Fälle von Intoxikationen bekannt.
Als Ursache für die Symptome bei einer Intoxikation wird jedoch nicht ausschließlich die Substanz selbst angeschuldigt. Vielmehr sind diese möglicherweise auf Xylene zurückzuführen, ein organisches Lösungsmittel, in dem Amitraz gelöst ist [16].

Die Literatur beschreibt lediglich organische und klinische Effekte bei einer Exposition mit Amitraz (siehe oben), Untersuchungen auf Zellebene und hier speziell bezüglich Genotoxizität finden sich nicht.

In unserem Versuch konnten wir signifikante genotoxische Effekte an Lymphozyten nach Exposition mit Amitraz nachweisen. Auf Zellebene fand

sich eine deutliche genotoxische Reaktion, die mit zunehmender Substanzkonzentration anstieg, wobei die Zellvitalität dabei deutlich rückläufig war. Bei einer Inkubation mit der 1 mM/ml Wirkstoffkonzentration zeigten sich bei 82,5% der untersuchten Zellen Erbgutschäden.
Insgesamt korrelierten die Werte der Ergebnisse gut um den errechneten Mittelwert.
Wir verwendeten Amitraz 99,0% (Agr Evo) in Substanzmengen zwischen 10,34 und 10,4µg.
Die Substanz wies große Reinheit auf, beinhaltete also auch kaum Beimengungen von Lösungsmitteln wie Xylene.

Daraus resultiert, daß auch Amitraz allein genotoxische Potenz besitzt, obgleich in der Literatur eher Lösungsmitteln wie Xylenen die eigentliche toxische Bedeutung zugemessen wird und über Vergiftungen mit Amitraz trotz seiner häufigen Verwendung als Akarizid eher selten berichtet werden.

4.2.2 Pyrethroide

Die Gruppe der Pyrethroide läßt sich in zwei Gruppe einteilen: Die Gruppe der Naturpyrethroide und die der synthetisch hergestellten, die in ihrer chemischen Strukturformel die Naturpyrethroide als Grundlage verwenden.

4.2.2.1 Naturpyrethrum (Gruppe der Pyrethrine)

Naturpyrethrum (Pyrethrin, Cinerin, Jasmolin) 50% (w/w) kommt als Inhaltsstoff in Chrysanthemenblüten vor und wurde als solcher im 18. Jahrhundert in Asien entdeckt. In Europa fanden die getrockneten Blüten als Insektenpuder Anwendung [11, 58].

Im 19. Jahrhundert konnten aus diesem Naturstoff dann die synthetischen Pyrethroide entwickelt werden [53, 116].
Die Substanz gilt als Insektizid mit Berührungsgiftwirkung und wird gegen beißende und saugende Insekten im Obst-, Gemüse-, Acker- und Weinbau sowie bei Zier- und Zimmerpflanzen eingesetzt, dabei wird sie ähnlich wie Piperonylbutoxid gern mit anderen Insektiziden gemischt. Die gebräuchlichsten Anwendungsformen sind Emulsionen und Sprühaerosole.

4.2.2.1 Expositon humaner Lymphozyten mit Naturpyrethrum (Gruppe der Pyrethrine)

Naturpyrethrum wird in der Literatur nicht als genotoxisch wirksame Substanz beschrieben. In den von uns durchgeführten Versuchen an humanen Lymphozyten zeigte sich eine deutliche genotoxische Reaktion vor allem in niedrigen Konzentrationsbereichen (0,5 mMolare Lösung). Hier zeigten sich Kometenlängen von 56µm.
In höheren Konzentrationen erreichte die Anzahl der geschädigten Zellen fast ein Steady State. Hier fand sich nur noch eine geringe genotoxische Reaktion.
Die verwendeten Substanzmengen lagen zwischen 11,19 und 14,58 µg.
Tisch et. al. fanden ähnliche Ergebnisse von genotoxischen Reaktionen bei nasalen Schleimhautepithelien [139].

4.2.2.2 Synthetische Pyrethroide

Bei dieser Substanzgruppe handelt es sich um Ester spezifischer Säuren und Alkohole, die als Gemisch mehrerer optischer Isomere vorliegen und strukturell mit den aus Chrysanthemen extrahierten natürlichen Pyrethrumwirkstoffen verwandt sind.

Sie bewirken eine Verlängerung des physiologischen Natriumeinwärtsstroms in Nervenbahnen während der Erregungsphase, wodurch es zu repetitiven Entladungen kommt [100].
Die synthetischen Pyrethroide werden unterteilt in Ester mit und ohne α Cyanogruppe.

Ester mit Cyanogruppe führen zu einer Depression von Nervenimpulsen in sensorischen Nervenfasern und verursachen eine intensivere Reaktion an den Sinnesorganen der Haut und führen im Falle einer Intoxikation zum sogenannten CS-Syndrom, gekennzeichnet durch Choreoathetose und Salivation. Zu dieser Gruppe gehört Cyfluthrin.

Ester ohne Cyanogruppe hingegen erhöhen die Aktivität an sensiblen Rezeptoren, sensorischen afferenten Nervenfasern und motorischen Endplatten. Im Falle einer Intoxikation führt dies zum sogenannten T-Syndrom und bewirkt Tremor. Zu dieser Stoffgruppe gehören Bioresmethrin und Permethrin [25, 100, 115, 146].

4.2.2.2.1. Exposition humaner Lymphozyten mit Bioresmethrin

Bioresmethrin (5-Benzyl-3-furylmethyl (1R, 3R)-2,2-dimethyl-3-(2-methyl-prop-1-enyl)cyclopropancarboxylat) konnte 1965 von Elliot et al. durch Austausch der Alkoholkomponente Allethrin gegen 5-Benzylfuryl-3-methanol gewonnen werden [110, 116].
Es ist ein Insektizid mit Berührungsgiftwirkung und in gebräuchlichster Form als Aerosolspray erhältlich. Ein spezielles Antidot bei Intoxikation ist nicht bekannt [101].

In Arbeiten von Hoellinger et al. (1987), die in vitro Experimente an humanen Lymphozyten mit Bioresmethrin, Cismethrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin durchführten fanden sich keine Hinweise auf genotoxische Wirkungen. In Arbeiten von Surralés et al. (1995) zeigten sich bei Versuchen mit Cypermethrin, Deltamethrin, Fenpropathin, Fenvalerat und Permethrin jedoch deutliche genotoxische Wirkung [57, 134].

Wir fanden in dem von uns durchgeführten Versuch sowohl für Permethrin wie auch für Bioresmethrin eine deutliche genotoxische Reaktion der Lymphozyten nach Exposition.

Die Werte für das Olive Tail Moment stiegen dabei bei Bioresmethrin von 0,64 in der Lösungsmittelkontrolle auf 16,57 in der 1 mMolaren Lösung.
Wir verwendeten Substanzmengen zwischen 10,96 und 13,96 µg.
Die Werte des Olive Tail Moments <2 erfuhren einen deutlichen Rückgang von 93,8 auf 17,1%.

4.2.2.2.2 Exposition humaner Lymphozyten mit Cyfluthrin

Bei Cyfluthrin (3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäurecyan-(4-fluor-3-phenoxyphenyl)-methylester) 94,9%, handelt es sich um ein Insektizid mit Kontakt- und Fraßwirkung, das auf das Nervensystem von Insekten wirkt. Eingesetzt wird es vor allem im Gemüse-, Obst- und Weinanbau, sowie gegen Vorrats- und Hygieneschädlinge. Nach der Gefahrstoffverordnung wird es als mindergiftig (Xn) eingestuft. Auch bei dieser Substanz ist kein spezielles Antidot im Falle einer Intoxikation bekannt [101].

Untersuchungen zur Genotoxizität von Cyfluthrin an humanen Lymphozyten fanden sich in der Literatur nicht.

In unserem Versuch zeigte sich die hauptsächliche genotoxische Wirkung auf die DNS der Lymphozyten im niedrigen Konzentrationsbereich. Wir verwendeten Substanzmengen zwischen 10,3µg und 34,69µg 94,9% Cyfluthrin.

Das Olive Tail Moment und das Tail Extent stiegen zwischen Lösungsmittelkontrolle und 0,5 mM Lösung am Stärksten an. Auch der Abfall des OTM<2 war hier am deutlichsten. Zwischen der 0,5 und der
1 mM Lösung war ein vergleichsweise geringer Anstieg bzw. Abfall der Werte zu verzeichnen. Ähnliche Effekte fanden Tisch et. al. an nasalen Schleimhautepithelien [139].
Dies sollte sicher Anlass zu genaueren Untersuchungen sein.

4.2.2.2.3 Exposition humaner Lymphozyten mit Phenothrin

d-Phenothrin (3-Phenoxybenzyl-(1R,3R; 1R,3S)-2,2dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl)cyclopropancarboxylat) 94,3% ist ein Gemisch aus cis- und trans-Isomeren.
Als Insektizid mit Kontakt- und Fraßwirkung bei schnellem „Knock-down"-Effekt wird es als Haushaltsinsektizid, Vorratsschutzmittel und bei Kopflausbefall eingesetzt. Es ist in den verschiedensten Anwendungsformen vom Aerosol bis zum Shampoo erhältlich [101, 112, 149].

Studien bzw. Literaturangaben zur Genotoxizität von Phenothrin beim Menschen finden sich nicht.

In den von uns durchgeführten Versuchen konnten wir für Phenothrin eine genotoxische Reaktion bei humanen Lymphozyten nachweisen. Die stärkste Reaktion fand sich dabei im Vergleich der Lösungsmittelkontrolle und der 0,5 mM Lösung, sowie zwischen der 0,5 mM Lösung und der 0,75 mM Lösung. Die Werte des OTM stiegen um 11 bzw. um 4,81. Auch für das Tail Extent und das OTM<2 war in diesen Bereichen die stärkste Reaktion zu verzeichnen.
Die von uns verwendete Substanzmenge betrug dabei zwischen 10,36 µg und 15,86 µg Substanz.

4.2.2.2.4 Exposition humaner Lymphozyten mit Permethrin

Permethrin (3-Phenoxybenzyl-(1RS, 3RS; 1 RS, 3SR)-3-(2,2-dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarboxylat), cis:trans = 25:75, gehört zu den synthetischen Pyrethroiden mit Cyanogruppe und damit zu den toxischeren Vertretern dieser Substanzgruppe [133].

Es gilt als ideale Verbindung bei der Bekämpfung von Ektoparasiten und wird u.a. zur Imprägnierung von Bettnetzen, Vorhängen, Schirmen sowie Kleidung verwendet [92, 94, 111, 112, 113, 114, 115].
Die Substanz selbst liegt in cis- und trans-Enantiomeren-Form vor, wobei cis-Permethrin wesentlich toxischer ist als die trans-Form [24, 46, 88, 153].

Beide Formen werden als Insektizide mit Fraß- und Berührungswirkung eingesetzt, wobei der Repellenteffekt eher gering ist. Auf diese Weise können beißende und saugende Insekten im Gemüse-, Kernobst-, Wein- und Zierpflanzenanbau bekämpft werden, jedoch auch im Hygienesektor findet die Substanz Anwendung. Die gebräuchlichste Anwendungsform ist das emulgierbare Konzentrat, aber auch die Aerosolform gilt als wirksam im Einsatz gegen Schädlinge.

Die kutane Absorbtion der Substanz ist als vernachlässigbar gering einzustufen, sofern nicht durch Salben oder Öle eine Resorptionsschiene geschaffen wird, mit dem die Haut penetriert werden kann [116], was die Toxizität der Pyrethroide nachhaltig beeinflusst [147].
Untersuchungen ergaben, dass Permethrin in mehr als 2/3 aller Hausstaubproben nachweisbar ist. Außerdem fanden sich Rückstände der Substanz auch in Nahrungsmitteln. Permethrin trägt damit erheblich zur toxischen Grundbelastung des Menschen bei [22].

Wie schon erwähnt führten Hoellinger et al. und Surralés et al. Versuche mit Pyrethroiden und humanen Lymphozyten durch [57, 134].

Aufgrund der Ergebnisse unseres Versuchs konnten wir eine eindeutige genotoxische Reaktion nachweisen, während Surralés et al. eine kaum erkennbare genotoxische Reaktion bei Anwendung von Permethrin feststellten. Sie wendeten in ihrem Versuch den Mikronukleus Test an [134].

Wir fanden eine Linearität der genotoxischen Reaktion mit zunehmender Substanzkonzentration in unserem Versuch für das Olive Tail Moment und den Tail Extent.

In der Angabe von „Environmental Health Criteria 94 (World Health Organisation 1990)“ wird die Wahrscheinlichkeit, daß Permethrin beim Menschen Krebs erzeugt als extrem unwahrscheinlich eingestuft. Darüber hinaus gäbe es keinen Hinweis darauf, daß Permethrin beim Menschen nachteilige Effekte auslösen würde.

In IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic risks (1991) lagen keine Daten zu genetischen Effekten von Permethrin auf den Menschen vor.

Pluijmen et al. [104] testeten sieben Pyrethroide u.a. Permethrin und Bioresmethrin auf mutagene Effekte bei Salmonella typhimurium und V79 Chinesische Hamster Zellen. Die berichtete Abwesenheit von DNS Schäden wird jedoch nicht als absolutes Ausschlußkriterium für karzinogene und mutagene Aktivität gewertet.
Wir fanden bei Permethrin deutliche Hinweise auf eine Genotoxizität. Dies beschrieben auch Barrueco et al. in ihrem Artikel „Cytogenetic effects of permethrin in cultured human lymphocytes“ [6].

Sie testeten Permethrin auf seine Fähigkeit Schwesterchromatidaustausche, Mikronucleolus- und strukturelle Chromosomenaberationen in humanen Lymphozyten zu induzieren.
Dabei fanden sie heraus, daß es nur geringe Anstiege im Schwesterchromatidaustausch gab, die keine biologische Bedeutsamkeit haben.
Darüberhinaus war kein Dosis-Wirkungs-Anstieg nachweisbar.
Permethrin induziert in Abwesenheit eines metabolischen Aktivationssystems (in diesem Falle Rattenleberaktivationssystem) Mikronukleolus- und strukturelle Chromosomenaberrationen. Es kann jedoch nicht behauptet werden, daß dieses metabolische Aktivationssystem die Aktivität von Permethrin unterdrückt.

Die Wirksamkeit von Permethrin scheint von der Dauer der Exposition abhängig zu sein. Permethrin kann als S-Phasen unabhängiges Agens mit einem größeren Potential für Chromosomenzerstörung als für den Austausch von Schwesterchromatiden bezeichnet werden [6, 7, 56].

In dem von uns durchgeführten Versuch stiegen die Werte für das Olive Tail Moment bei Permethrin von 0,79 in der Lösungsmittelkontrolle auf 15,25 in der 1 mM Lösung. Wir verwendeten dabei Stoffmengen zwischen 12,6 µg und 18,76 µg.

Die Werte des OTM<2 erfuhren dabei einen deutlichen Rückgang von 94,6 auf 28,7%, d.h. in der 1,0 mM Lösung fanden sich nurmehr 28,7% ungeschädigte Zellen.

Tisch et al. untersuchten die genotoxische Wirkung von Permethrin an nasalen Schleimhautzellen. Dabei fanden sie ebenfalls konzentrationsabhängig genotoxische Effekte. [141]

4.2.2.2.5 Exposition humaner Lymphozyten mit Transfluthrin

Zu Transfluthrin finden sich in der Literatur nur wenig Daten.
Für die in unserem Versuch mit Transfluthrin an humanen Lymphozyten festgestellte Genotoxizität fanden sich keine vergleichbare Daten. Tisch et. al fanden diesen Effekt an nasalen Schleimhautzellen [139]. Auch sie beobachteten konzentrationsabhängig eine genotoxische Wirkung.

Transfluthrin wies ein OTM von 11,36 in der 0,5 mM Lösung auf. Auch bei dieser Substanz fand die stärkste Reaktion von OTM, TE und OTM<2 zwischen der Lösungsmittelkontrolle und der 0,5 mM Lösung statt. Es fand sich für das Olive Tail Moment hier ein Reaktionszuwachs von insgesamt 10,7, beim TE von 35,9 µm und bei OTM<2 ein Abfall von 64,2%. Bei den Reaktionen zwischen 0,5 mM und 1,0 mM Lösung war im Vergleich dazu nur ein geringer Wertzuwachs zu verzeichnen.
Die von uns verwendeten Substanzmengen betrugen zwischen 10,41 µg und 13,32 µg.

Zusammenfassend lässt sich für die Stoffgruppe der Pyretroide feststellen, dass bei allen sechs Vertretern eine genotoxische Reaktion nach Exposition zu verzeichnen war.

Bioresmethrin zeigte dabei den geringsten genotoxischen Effekt im niedrigen Konzentrationsbereich. Phenothrin und Cyfluthrin zeigten unter den Vertretern dieser Substanzgruppe bei der 1 mM Lösung die stärksten genotoxischen Effekte. Sicher wäre es interessant in einer Folgearbeit zu untersuchen, warum die Vertreter aus der Stoffgruppe der Pyrethroide so unterschiedlich reagieren und wie sich das Reaktionsverhalten im niedrigen Konzentrationsbereich (<0,5 mM) äußert.

4.2.3 Thiophosphonate

4.2.3.1 Exposition humaner Lymphozyten mit Diazinon

Diazinon (O, O-Diethyl-O-(2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl)thiophosphat) aus der Gruppe der Thiophosphonate findet als Insektizid und Akarizid mit Kontakt-, Fraß- und Atemwirkung Anwendung.
Es wird schnell resorbiert und hat eine schnelle und gründliche Anfangswirkung.
Eingesetzt wird es gegen Schadinsekten in Gemüse- und Obstanbau. Vom Wirkmechanismus her gilt es unter anderem als Cholinesterasehemmstoff. Dabei hemmt es das aktive Zentrum des Enzyms und bewirkt dadurch eine irreversible Hemmung und damit Anreicherung von Acetylcholin im Organismus, was zu nicotinergen und muscarinergen Effekten führt. Die Symptome äußern sich in Form von Bradykardie, generalisierter Vasodilatation, Miosis, vermehrter Sekretion der Drüsen, Muskelzuckungen und zentralnervösen Störungen wie Verwirrung, Krampfanfällen, Atem- und Kreislaufdepression bis hin zum Koma.

In der Gefahrstoffverordnung wird die Substanz als mindergiftig (Xn) eingestuft, gilt jedoch als gesundheitsschädlich bei inhalativen, oralen und

dermalen Kontakt. Daher ist beim Umgang auf adäquate Schutzkleidung zu achten.
Als Mittel der Wahl bei Intoxikation gilt Atropin bzw. Obidoxim.
Über den Schweregrad der Vergiftung kann dabei die Aktivität der Acetylcholinesterase in den Erythrozyten Auskunft geben [101, 149].

In der Literatur finden sich keine Angaben zu Versuchen von Diazinon an humanen Lymphozyten.
Im Artikeln von Cantor et al. „Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin´s lymphoma among men in Iowa and Minesota“, wird jedoch ein erhöhtes Risiko für Non-Hodgkin Lymphome beim Umgang mit Insektiziden wie Diazinon und Malathion beschrieben [23].

Es wird darauf hingewiesen, daß ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Lymphome und dem Kontakt mit Diazinon vor allem vor der Einführung von Schutzkleidung und -maßnahmen, d.h. vor 1965, bestand.

Außerdem wird darauf hingewiesen, daß die Exposition gegenüber zahlreichen Insektiziden die Schwierigkeit mit sich bringt, das Risiko im Umgang mit der Einzelsubstanz einzuschätzen [23].
Marinovich et al. untersuchten den Effekt von Pestizidmischungen auf Nervenzellen in vitro im Vergleich mit den einzelnen Pestiziden. Sie verwendeten unter anderem Diazinon und konnten feststellen, daß es nicht möglich ist, die Toxizität von Pestizidmischungen aufgrund der Toxizität der einzelnen Pestizide vorherzusagen [81].

In unserem Versuch konnten wir eindeutig genotoxische Effekte für Diazinon an humanen Lymphozyten nachweisen. Tisch et. al. konnten diesen Effekt an nasalen Schleimhautzellen und Tonsillengewebe beobachten [138, 141].

Die Toxizität von Diazinon in unserem Versuch stieg dabei mit wachsender Konzentration linear an, was an den Werten für OTM und TE zeigte. Das OTM stieg dabei von 1,06 in der Lösungsmittelkontrolle auf 14,02 in der niedrigsten Konzentration
(0,5 mM) bis zu 24,51 in der 1 mM Lösung. Für das TE läßt sich ein Anstieg um insgesamt über 70 µm verzeichnen.
Die verwendeten Substanzmengen betrugen dabei zwischen 10,26 µg und 13,48 µg.

Vergleicht man die Ergebnisse der Exposition mit Diazinon mit denen von Malathion, das auch als Cholinesterasehemmstoff gilt, also vom Wirkmechanismus vergleichbar ist, findet man ähnliches Verhalten der Werte für OTM, TE und OTM<2 im Verlauf des Konzentrationsanstiegs.
Beide Substanzen zeigen genotoxische Reaktionen an humanen Lymphozyten.

4.2.4 Glykolether

4.2.4.1 Exposition humaner Lymphozyten mit Piperonylbutoxid

Piperonylbutoxid (5-[2-(2-Butoxyethoxy)ethoxymethyl]-6-propyl-1,3-benzodioxol) 90% aus der Gruppe der Glykolether gilt als „Synergist zur Steigerung der Wirksamkeit von Pyrethrinen und Pyrethroiden durch Verbesserung der Stabilität von Pyrethrumextrakt“ [40].

Verwendung findet es fast ausschließlich in Substanzgemischen, meist mit Pyrethroiden. Dies führt zur Steigerung der Penetrierbarkeit und verbessert die metabolische Stabilität der Pyrethroide (durch Hemmung der Monooxygenase) [17] und steigert auf diese Weise auch deren Toxizität [24].

In der Mischung mit Pyrethroiden wird die Substanz als Aerosol, Emulsion, Öl oder Puder eingesetzt, ist jedoch auch mit anderen handelsüblichen Insektiziden mischbar.
Ein spezielles Antidot ist nicht bekannt. Im Falle einer Intoxikation muß symptomatisch behandelt werden [101].

Literaturdaten zu Piperonylbutoxid sind sehr spärlich. Insbesondere fanden sich keine Daten zur Genotoxizität der Substanz an humanen Lymphozyten. Tisch et al. konnten diesen Effek an menschlichem Tonsillengewebe beobachten [138].

In den von uns durchgeführten Versuchen fand sich eine deutliche genotoxische Reaktion.
Bei Substanzmengen zwischen 10,85 µg und 11,98 µg konnte in der 0,5 mM Lösung ein OTM von 14,8 erreicht werden, dies bedeutet im Vergleich zur LK eine Steigerung um 14,05. Eine weitere Steigerung fand sich in der Exposition mit der 0,75 mM Lösung. In der 1,0 mM Lösung wird schließlich ein Steady-state im Sinne einer Sättigungskinetik erreicht.
Die Werte des TE verhalten sich ebenso. Das OTM<2 fällt deutlich ab, bis zu 15,5% in der 1,0 mM Lösung, was eindeutig für die Genotoxizität der Substanz spricht.
Die dabei verwendete Substanzmenge betrug zwischen 11,32 µg und 13,13 µg.

4.2.5 Cholinesterasehemmstoffe

4.2.5.1 Exposition humaner Lymphozyten mit Malathion

Malathion wird chemisch als S-[1,2-bis(Ethoxy-carbonyl)ethyl]-0,0-dimethyl-dithiophosphonat bezeichnet. Es gehört in die Gruppe der

Cholinesterasehemmstoffe und gilt als Insektizid und Akarizid mit Berührungsgiftwirkung und geringerer Fraß- und Atemgiftwirkung.

Bevorzugt angewandt wird die Substanz gegen saugende Insekten im Obst-, Gemüse- und Zierpflanzenanbau, desweiteren gegen Obstmaden (hier in Kombinationsprodukten), sowie gegen Vorratsschädlinge (hier durch Bodenbehandlung von Räumen).

In den meisten organischen Lösungsmitteln (Alkoholen, Estern, Ketonen, Ethern, aromatischen Kohlenwasserstoffen) ist Malathion leicht löslich, in Petrolether und einigen Mineralöltypen wenig löslich.
Die gebräuchlichste Anwendungsform ist ein Emulsionskonzentrat.

Im Insektenorganismus kommt es nach Aufnahme von Malathion zur Oxidation des Stoffes zu Malaoxon, einem Thiolphosphat, daneben auch zur Hydrolyse zu Derivaten der Bernsteinsäure und anderen Carbonsäuren,
0,0-Dimethylthiophosphorsäure und Phosphorsäure.

Im Umgang mit Malathion sind die üblichen Schutzmaßnahmen zu treffen. Besondere Gefahren ergeben sich im Umgang mit der Substanz nicht [100].

Symptome einer Intoxikation sind bei leichten Vergiftungen: Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Schwindel, Schwächegefühl, Tremor der Lider; Miosis, Sehstörungen, Salivation, Tränenfluß, Schwitzen, Bauchschmerzen und Bradykardie. Die Serumcholinesterase Aktivität ist bei diesen leichten Vergiftungen beträchtlich erniedrigt, fällt aber nicht unter 40% der Norm ab.

Bei schweren Vergiftungen kommt es neben Muskelfaszikulationen zu starkem Durchfall, Atemnot, bronchiale Hypersekretion, Lungenödem, Zyanose, Koma,

generalisierte Krämpfe bis hin zum Herzstillstand. Die Cholinesteraseaktivität sinkt bei schweren Vergiftungen bis unter 20% der Norm ab. Bei chronischer Exposition ist die Bestimmung der Erythrozytencholinesterase zuverlässiger [117].

Bei Intoxikation sind zwei Antidote bekannt: Atropin und Toxogonin.

In der BRD gilt Malathion als Kombinationsprodukt mit Methoxychlor als gesundheitsschädlich (Gefahrensymbol Xn) [101].

Goedicke et al. beschrieben eine relativ starke Penetrationsfähigkeit von phosphororganischen und Carbamatininsektiziden, die mit der Wasserlöslichkeit der Wirkstoffe zunimmt sowie durch Lösungsmittel und oberflächenaktive Formulierungsbestandteile verstärkt wird. Außerdem wird auf eine unterschiedliche dermale Penetrationsfähigkeit an verschiedenen Hautarealen hingewiesen [47].

In der Literatur finden sich zahlreiche Artikel und Studien zur Genotoxizität von Malathion [138].

Ob die Substanz selbst genotoxisch ist scheint dabei umstritten zu sein.
In der Mehrzahl der Studien an Bakterien und Hefen ließ sich kein mutagener Effekt nachweisen [45, 86, 92, 120, 150, 155, 158].

Erhöhte Genotoxizität von Malathion fanden sich dagegen in den Studien von Tennant et al. und Myhr et al., die Tests an Mauslymphom Thymidinkinase durchführten [135].

Degrave et al. und Degrave und Moutschen fanden in Studien mit Knochenmarkszellen, Spermatogonien und Spermatozyten von Mäusen nach Malathionexposition hingegen keinen Anstieg der Chromosomenaberationen [31, 32].

Andere Studien an menschlichen Zellen ergaben einen signifikanten Anstieg an Chromosomenaberationen und Schwesterchromatidaustauschen nach Exposition mit Malathion [42, 55, 96, 123, 150].

Auch gibt es auch einige Hinweise auf teratogene Effekten bei Rattenbabys.
Diese wurden mit 240 mg/kg/d Malathion gefüttert und wiesen Wachstumsretardierung und gesteigerte Mortalität auf, obgleich bei den Elterntieren keine negativen Effekte beobachtet wurden [66].

Viele in vivo Studien mit Malathion zeigten genotoxische Effekte.
Yoder et al. fanden einen 5-fachen Anstieg von Chromatidbrüchen bei Farmern, die während der Sommerzeit, in der der Verbrauch an Pestiziden am höchsten ist [158], regelmäßig Kontakt mit Malathion hatten.

Van Bao beobachtete Individuen, die ausschließlich hohen Dosen Malathion ausgesetzt waren, und fand einen signifikanten Anstieg von stabilen und instabilen Chromosomenaberationen. Diese chromosomalen Veränderungen fanden sich sowohl unmittelbar als auch 1 Monat nach Exposition mit dem Pestizid [143].

Lipkowitz et al. zeigten, daß die Exposition mit Pestiziden (darunter auch Malathion) bei Landarbeitern eine 10-20-fache Steigerung von chromosomalen Aberationen bewirkte.

Obgleich diese an sich keine onkogene Potenz haben, glaubten die Forscher, daß das vermehrte Auftreten dieser Aberation auch mit einem generellen Anstieg des Krebsrisikos vergesellschaftet sein könnte [77].

Anhand unserer Ergebnisse läßt sich für Malathion eine genotoxische Potenz nachweisen. In dem von uns durchgeführten Versuch verwendeten wir Malathion 96% in Mengen zwischen 12,08 µg und 17,15 µg für die 1 mM Lösung.

Natürlich können wir nicht ausschließen, daß der genotoxische Effekt nicht auf die Substanz als solche, sondern auf Verunreinigungen zurückzuführen ist, die während der Herstellung oder Lagerung der Substanz entstehen. 11 dieser verunreinigenden Stoffe sind bekannt [143].
Darunter sind Malaoxon, das durch Oxidation von Malathion entsteht und Isomalathion, das durch Isomerisation aus Malathion entsteht.

Blasiak et al. untersuchten Malathion und seinen Metaboliten Malaoxon sowie die isomere Substanz Isomalathion an humanen Lymphozyten in Konzentrationen, die denen im Blut von malathionexponierten Versuchspersonen ähnelten.

Dabei fanden sie heraus, daß die Reinsubstanz Malathion keine Veränderungen in der Kometenlänge bewirkt, Malaoxon und Isomalathion hingegen DNS-Schäden in dosisabhängiger Art zeigten. Auch diese Forschergruppe kommt zu dem Schluß, daß der scheinbar durch Malathion induzierte genotoxische Effekt eher auf der Biotransformation der Substanz zu Malaoxon bzw. Isomalathion und dem Vorhandensein anderer verunreinigender Substanzen mit eigenem genotoxischen Potential beruht. Damit scheint auch die Möglichkeit zur

Induktion von DNS-Schäden in vivo und damit die Induktion von Karzinomen gegeben zu sein [14].

Auch Flessel et al. stützen die These, daß Malathion selbst nicht genotoxisch ist, Malaoxon hingegen als aktiver Metabolit von Malathion eine starke genotoxische Potenz aufweist. Die Forschergruppe untersuchte die Ergebnisse verschiedener Studien mit Malathion. Sie fanden heraus, daß technisches Malathion im Tierversuch chromosomale Schäden verursacht. Für den Menschen bestanden keine vergleichbaren Daten, daher hofft man auf exaktere Studien in diesem Bereich, da Malathion als Pestizid häufig eingesetzt wird.
Menschliche und tierische Zellen in Kultur wiesen unter Einfluß von technischem und reinem Malathion chromosomale Schäden auf. In Bakterien erzeugt Malathion keine Punktmutationen, im Gegensatz zu Malaoxon.

Die Interaktion von Malathion mit der DNS wurde in diesem Zusammenhang noch nicht genauer untersucht [40].

Pluth el al. wiesen nach, daß die Mutagenität von Malathion schon auf molekularer Ebene nachweisbar ist. Sie benutzten eine Klonuntersuchung, um die Genotoxizität einer in vitro Exposition an humanen Lymphozyten nachzuweisen. Dabei setzten sie Zellen in der G_0-Phase Dosen von Malathion zwischen 10 bis 600 µg/ml (letale humane Dosis 858 mg/kg KG) aus.

Diese Studie erbrachte den ersten Beweis eines Zusammenhangs zwischen Malathionexposition und spezifischen Mutationen an humanen Lymphozyten. Sie konnten außerdem nachweisen, daß bei Malathion eine geringe und variable Cytotoxizität besteht und darüberhinaus eine intraindividuell verschiedene Anfälligkeit gegenüber dem Insektizid existiert und die Mutagenität der Substanz variabel ist [105].

Figa-Talamanca et al. beschrieben eine deutlich erhöhte Sterblichkeit an hepatozellulären Karzinomen in einem Kollektiv von italienischen Desinfektoren und Schädlingsbekämpfern, die chlorierten Kohlenwasserstoffen, organischen Phosphorsäureestern und Arsenverbindungen im täglichen Umgang ausgesetzt waren. Sie führten die erhöhte Mortalität einerseits auf die Exposition gegenüber chlorierten Kohlenwasserstoffen und organischen Phosphorsäure-estern, anderseits auf Aflatoxine und Infektionen als mögliche Ursachen zurück [39].

Perger beschrieb in ihrem Artikel „Erkrankungen der Leber durch berufliche Exposition gegenüber Pestiziden“ ein leicht erhöhtes Risiko für verschiedene Krebsformen im Umgang mit Pestiziden. Der letztliche Beweis dafür sei aber aufgrund fehlender Angaben zu Expositionsbedingungen und anderer Einflußfaktoren noch nicht erbracht [99].

Gegen alle diese Thesen stehen Titenko-Holland et al. mit der Feststellung, daß die Gefahr von Chromosomenschäden durch die Exposition mit Malathion in vivo relativ gering ist [143].

In unserem Versuch konnten wir für Malathion eine klare genotoxische Potenz erkennen. Schon in geringen Dosierungen zeigte sich eine Steigerung des Olive Tail Moments um 15,23 und eine Zunahme des Tail Extent um 41,2 µm.

Dabei lag die verwendete Substanzmenge zwischen 12,08 µg und 17,15 µg.

4.2.6 Acetylcholinesterasehemmstoffe und Carbamate

4.2.6.1 Exposition humaner Lymphozyten mit Pyridostigminbromid

In der Literatur finden sich zahlreiche Artikel zu Pyridostigminbromid, jedoch keine Untersuchungen der Substanz hinsichtlich Genotoxizität.

In unseren Versuchen fanden wir an humanen Lymphozyten eindeutig genotoxische Effekte unter Exposition mit der Substanz, die proportional der ansteigenden Substanzkonzentration waren.

Die verwendete Substanzmenge lag dabei zwischen 10,85 µg und 11,98 µg.

4.2.7 Hemmung des GABA-regulierenden Chloridkanals

4.2.7.1 Exposition humaner Lymphozyten mit Fipronil

Die Literaturdaten zu Fipronil sind spärlich, insbesondere finden sich keine Daten zur genotoxischen Potenz der Substanz an humanen Lymphozyten.
Tisch et al. konnten genotoxische Effekte an Tonsillengewebe nachweisen [138].

In unseren Versuchen fanden wir dafür eindeutige Hinweise, wobei sich besonders zwischen der 0,75 mM und der 1,0 mM Konzentration eine Zunahme des Olive Tail Moments und damit der DNS-Brüche zeigte.

Die verwendeten Substanzmengen lagen zwischen 11,23 µg und 12,52 µg.

4.2.8 Silane

4.2.8.1 Exposition humaner Lymphozyten mit Siafluophen

In der Literatur finden sich keine Daten bezüglich der Genotoxizität von Siafluophen an humanen Lymphozyten. Tisch et al. fanden genotoxische Effekte an humanem Tonsillengewebe [138].

In den von uns durchgeführten Versuchen ließ sich jedoch eine eindeutige genotoxische Reaktion an humanen Lymphozyten nachweisen.
Das Olive Tail Moment und der Tail Extent stiegen dabei mit Zunahme der Molarität der Substanz proportional an. Der Anteil des Olive Tail Moment <2 hingegen verhielt sich umgekehrt proprotional und fiel mit steigender Substanzmolarität deutlich ab.

Verwendet wurden Substanzmengen zwischen 12,61 µg und 18,84µg.

4.2.9 Akarizide: Pyrazoloximether: Fenpyroximat

4.2.9.1 Exposition humaner Lymphozyten mit Fenpyroximate

Literaturdaten zu Fenpyroximat und dessen Genotoxizität an humanen Lymphozyten finden sich nicht.

In unserem Versuch konnten wir für sie Substanz an humanen Lymphozyten einen klaren Genotoxizitätsnachweis erbringen. Olive Tail Moment und Tail Extent stiegen mit wachsender Molarität der Substanz. Die Anzahl der Olive Tail Momente unter 2 fiel dementsprechend mit wachsender Lösungsmolarität proportional ab.

Die Substanzmengen betrugen zwischen 10,57 µg und 11,28 µg.

4.2.10 Insect Repellent: Ester, Amide

4.2.10.1 Exposition humaner Lymphozyten mit DEET

Die Literaturdaten zu DEET sind zahlreich, unter anderem deshalb, weil die Substanz als Insekten Repellent in Form von Lösungen, Gelen, Sticks und Aerosol Sprays sehr verbreitet ist und darüber hinaus über eine hohe Effektivität verfügt [33, 94].

Leider finden sich keine Artikel und Daten, die die Genotoxizität von DEET an humanen Lymphozyten beschreiben. Tisch et al. fanden genotoxische Effekte an nasalen Schleimhautzellen [141].

In unserem Versuch konnten wir eine Genotoxizität der Substanz an humanen Lymphozyten mit Hilfe von Mikrogelelektrophorese und Comet Assay schon in sehr niedrigen Konzentrationen nachweisen.
Die Anzahl der DNA Brüche nahm dabei mit steigender Molarität der verwendeten Lösung linear zu, die Anzahl der intakten DNA Stränge umgekehrt proportional ab. Die verwendeten Substanzmengen lagen dabei zwischen
10,65 µg und 14,83 µg.

DEET ist damit eine weitere Substanz, für die genotoxische Reaktionen an humanen Zellen nachgewiesen werden konnte.

4.2.10.2 Exposition humaner Lymphozyten mit 3535

In der Literatur finden sich zu 3535 weder zur Genotoxizität noch zur Mutagenität Daten.
„Im Ames Test an Bakterien wirkte 3535(mit und ohne metabolisierendes System) nicht mutagen. Unter Testbedingungen, unter denen die Positivkontrollen klare mutagene Wirkungen auslösten, zeigten Konzentrationen von 150-5000 µg Insekt Repellent 3535/ml keinerlei mutagene Wirkungen. Höhere Konzentration von Insekt Repellent 3535 hemmten das Bakterienwachstum“ [71].

Im CHO/HGPRT-Test zeigte Insekt Repellent 3535 auch keinerlei mutagene Wirkungen am HGPRT-Locus von CHO-Zellen. Untersucht wurden Konzentrationen von 0-4,2 µl/ml ohne, und Konzentrationen von 0-8 µl/ml mit metabolisierendem System [29].

In unserem Versuch hingegen konnten wir an humanen Lymphozyten eine eindeutige genotoxische Reaktion schon in niedrigen Konzentrationen nachweisen. In höheren molaren Konzentrationen hingegen stieg die Genotoxizität nicht mehr verstärkt an, sondern erreichte ein Steady State.
Die verwendeten Substanzmengen lagen zwischen 10,47 µg und 14,03 µg.

4.2.10.3 Exposition humaner Lymphozyten mit Dimethylphthalat

Literaturdaten zu Dimethylphthalat und einer genotoxischen Wirkung der Substanz finden sich nicht.
In unserem Versuch konnten wir eine genotoxische Wirkung beobachten, die den anderen beiden getesteten Repellentien DEET und 3535 ähnelt.

Auch bei diesen Substanzen fand sich die größte genotoxische Wirkung in der niedrig-molaren Lösung. Wurde die Molarität gesteigert, stieg die Anzahl der DNS-Brüche zwar immer noch an, jedoch in weitaus geringerem Maße als im Bereich zwischen Lösungsmittelkontrolle und 0,5 mM Lösung.
Die verwendeten Substanzmengen lagen zwischen 12,61 µg und 14,25 µg.

4.2.11 Substanzkombinationen

In der vorliegenden Arbeit testeten wir folgende Substanzkombinationen:
DEET-Pyridostigminbromid, DEET-Permethrin,
Permethrin-Pyridostigminbromid,
DEET-Pyridostigminbromid-Permethrin

Um festzustellen, ob sich die genotoxische Potenz einzelner Substanzen im Vergleich zu deren Kombinationen potenziert oder anderweitig verändert, wurden die Substanzen DEET, Permethrin und Pyridostigminbromid zuerst in Zweier- und schließlich in Dreierkombination getestet.

4.2.11.1 Expositon humaner Lymphozyten mit Kombinationen aus DEET, Pyrigostigminbromid und Permethrin

Insgesamt kann festgehalten werden, daß es durch die Kombination zweier Einzelsubstanzen miteinander zu einem deutlich höheren Anstieg des OTM kommt.
Werden alle drei Substanzen miteinander kombiniert, findet sich ein weiterer Anstieg. Man muß hier also nicht nur von einer Potenzierung der insektiziden Wirkung der Einzelsubstanzen ausgehen, wie die Forschergruppen um Young und Schreck herausfand [111, 159], sondern darüber hinaus auch von einer Zunahme der genotoxischen Reaktion, was wir anhand unserer Versuchsergebnisse belegen konnten.

Die von Baynes et al. durchgeführte Studie zur dermalen Absorption ergab, daß die Kombination von DEET und Permethrin zu einer verminderten dermalen Absorption von Permethrin führt [10].

Im Zusammenhang mit der Coexposition von Pyridostigminbromid, DEET und Permethrin während des Golfkriegs trat das sogenannte „Gulf war syndrome“ in Erscheinung, für das in der Literatur unterschiedliche Ursachen angeschuldigt werden [25].

Unklar ist bisher, ob die Ursachen für den Symptomenkomplex mit Namen „Golfkriegssyndrom“ in der Coexposition von Permethrin, DEET und Pyridostigminbromid liegt, denn die Ursachen scheinen vielfältig. Ficcara et al. nennen allein 10 mögliche Ursachen. Darunter sind zum einen Schadstoffbelastung der Luft durch die brennenden Ölquellen, aber auch die Belastung durch Pyridostigminbromid, das als Prophylaxe gegen mögliche Nervenkampfstoffe eingesetzt wurde, und andere Insektizide und Pestizide mit denen Uniform und Ausrüstung imprägniert wurden. Darüber hinaus muß natürlich auch der erhöhte mentale und physische Stress, dem die beteiligten Soldaten ausgesetzt waren, berücksichtigt werden.

Die Bedeutung der im Golfkrieg verwendeten Substanzen war unterschiedlich:
Pyridostigminbromid wurde den Soldaten zur Prävention einer Exposition mit Nervenkampfstoffen wie Sarin verabreicht.
DEET und Permethrin wurden als Insektizide zur direkten Anwendung auf der Haut als Repellent, aber auch als Sprays bzw. zur Imprägnierung der Uniform verwandt [58, 90, 91, 159].
Vergleichbare Symptome, wie sie beim Golfkriegssyndrom auftraten, fanden sich auch im Vietnamkrieg bei Exposition gegenüber „Agent Orange“, einem Herbizid mit der chemischen Bezeichnung 2,4,5-Trichlorophenoxyacet Säure,

das zur Entlaubung eingesetzt wurde, aber auch im ersten und zweiten Weltkrieg, wo DEET, Permethrin und Pyridostigminbromid noch nicht zur Verfügung standen und eingesetzt wurden. Die letzendliche Ursache für das Auftreten dieser Symptome konnte auch hier nicht sicher geklärt werden. Wahrscheinlich erscheint vielen Autoren ein multifaktorielles Geschehen [3, 38].

Die Forschergruppe um Mohamed Abou-Donia und Robert Haley führte die ersten Versuche einer simultanen Exposition mehrerer Insektizide (DEET und Permethrin) und anderer Substanzen (Pyridostigminbromid), die im Golfkrieg verwendet wurden, an Hühnern durch [1, 49, 50, 51].
Sie fanden heraus, daß, obgleich die einzelnen Substanzen in der verwendeten Konzentration keine Symptome hervorriefen, die Kombination massive Schädigungen des Nervensystems verursachte. Mikroskopisch zeigten sich bei den Versuchstieren aufgetriebene und teilweise zerstörte Nervenendigungen.
Die gefundenen Symptome ähnelten denen, an denen die Soldaten mit dem Golfkriegssyndrom litten. Eine mögliche Theorie hierfür war, daß die Kombination der drei Substanzen die Möglichkeit des Organismus hemmt, diese zu neutralisieren. Eine Schlüsselrolle hat hier das Enzym Buturylcholinesterase, das normalerweise chemische Verbindungen, die Stickstoff enthalten spaltet. Dieses Enzym wird scheinbar von Pyridostigminbromid besetzt und verhindert so den Abbau von Permethrin und DEET. Dies erklärt auch die verstärkte Penetration der Substanzen ins ZNS, da diese nun in höherer Konzentration vorliegen [49, 98].

Auch die Forschergruppe um James Hoy führte Untersuchungen mit allen drei Substanzen an Ratten durch. Dabei wurde beobachtet, inwieweit sich das Bewegungsverhalten und –geschwindigkeit unter Einwirkung der Substanzkombinationen ändert. Es konnten signifikante Verhaltensänderungen

festgehalten werden, die laut den Autoren vielleicht den Schlüssel zum Verständnis der Symptome des Golfkriegssyndroms darstellen [49].

Als Erklärung vermutet die Forschergruppe um Abou-Donia und Robert Haley eine gesteigerte neurotoxische Wirkkonzentration von DEET und Permethrin aufgrund der Hemmung der Buturylcholinesterase durch Pyridostigminbromid [1, 49].
Alle drei Substanzen werden durch Zytochrom P-450 in der Leber und durch hydrolysierende Plasmaenzyme abgebaut [24, 33, 43, 117].

Esterasen schützen das Nervensystem vor xenobiotischen Substanzen, indem sie deren Ausscheidung aus dem Körper beschleunigen bzw. sie in wasserlösliche Bestandteile spalten [154].

Die Prophylaxe mit Pyridostigminbromid gegen Nervenkampfstoffe hängt von der reversiblen Bindung und der temporären Besetzung der Rezeptoren der peripheren Acetylcholinesterase ab.

Pyridostigminbromid hemmt sowohl als Einzelsubstanz, wie auch in Kombination mit anderen Substanzen die Plasmacholinesterase signifikant.
Die verminderte Esteraseaktivität im Blut bei Verwendung von Kombinationssubstanzen hat daher eine verminderte metabolische Biotransformation von DEET und Permethrin und eine gesteigerte Bioverfügbarkeit am Nervensystem zur Folge.

Die gesteigerte Wirkung der Kombination der Einzelsubstanzen ist einerseits auf deren Wirksamkeit an sich, wie auch auf das oben beschriebene Phänomen der verminderten Esteraseaktivität zurückzuführen. Dabei muß jedoch festgehalten werden, daß Pyridostigminbromid die Bluthirnschranke nicht passiert, die

gesteigerten ZNS Effekte also dann möglicherweise eher auf die gesteigerte Wirkungsamkeit von DEET und Permethrin aufgrund verlängerter Halbwertszeiten, damit auch der besseren Möglichkeit ins ZNS zu permetrieren, zurückzuführen sind.

Hier sind insbesondere auch die Personen einer höheren Gefährdung ausgesetzt, die an einem angeborenen Plasmacholinesterasedefekt leiden bzw. eine verminderte Aktivität der Plasmacholinesterase haben [1, 73].

Der Cholinesterasedefekt, bei dem an Position 70 die Aminosäure Aspartat gegen Glycin ausgetauscht ist, macht eine Hydrolysierung von Succinylcholin unmöglich [65, 91, 98].

Individuen mit einer verminderten Plasmacholinesteraseaktivität sind daher besonders anfällig und gefährdet bei einer gleichzeitigen Exposition mit Anticholinesterase und anderen Substanzen. Dies mag auch eine der Ursachen von schwereren Symptomen sein, an denen 4% der Golfkriegsveteranen leiden [1, 63].

Wichtig ist auch auf die Bedeutung der sogenannten „mutiple drug sensitivity“ als mögliche Ursache der Erkrankung hinzuweisen, einer unklaren Gesundheitsstörung, die durch Exposition gegenüber chemischen Substanzen ausgelöst werden kann und, dem Golfkriegssyndrom vergleichbar, eine Vielzahl von verschiedensten Symptomen auslösen kann. Der Grund hierfür ist nicht eindeutig geklärt. Unter anderem wird eine Wirkungspotenzierung durch gleiche Wirkmechanismen der Einzelsubstanzen diskutiert [74, 83, 111].

Hier kommt dem Enzym Buturylcholesterinesterase besondere Bedeutung zu. Dieses Enzym zirkuliert im Blut und löst eine Anzahl von stickstoffenthaltenden

organischen Verbindungen auf. Pyridostigminbromid kann das Enzym so hemmen, daß es den Abbau der Insektizide DEET und Permethrin verhindert. Diese können dann ungehindert ins Nervensystem gelangen und dort Schäden verursachen, die die Einzelsubstanzen ansonsten nicht auslösen würden. Unklar ist derzeit noch, ob dieselben Mechanismen nicht nur im Tierversuch sondern auch beim Menschen auftreten. In einem Artikel von Pennisi sind Studien um die Forschergruppe von G. Jamal an der Universität von Glasgow zitiert. Jamal konnte anhand seiner Versuche Unterschiede in der Nervenfunktion von betroffenen Soldaten feststellen [98].

Im Gegensatz dazu stehen die von Buchholz et al. durchgeführten Experimente an Ratten. Sie fanden bei gleichzeitiger Verabreichung von Pyridostigmin und Permethrin eine verringerte Konzentration von Permethrin im ZNS und einen (wenngleich nur schwach signifikanten) Abfall der Konzentration im Blut Die 30% Reduktion von Permethrinäquivalenten steht größenmäßig in Einklang mit der Abnahme von Organophosphaten bei vorheriger Gabe von Physiostigmin [18].

Bei Ratten wurde bei Verabreichung der Substanzkombination eine gesteigerte Letalität gefunden. Dabei lagen die applizierten Einzelkonzentrationen im subletalen Bereich [85].

Hoy et al. fanden zusätzlich Unterschiede im Bewegungsverhalten bei Ratten nach Verabreichung der Substanzen. Bei der Verabreichung von Doppelkombinationen ergab sich Verlangsamung im Bewegungsverhalten [58].

Bei Pyridostigmin hängt die Wirkung von der prozentualen Hemmung der Plasmacholinesterase ab. Tierversuche an Ratten ergaben, daß orale Dosen Pyridostigminbromid, die eine 73%ige Hemmung der Plasmacholinesterase

verursachten, einen signifikanten Anstieg der Neurotoxizität von Sarin bewirkten [70, 119].

Eine Pyridostigminbromiddosis, die eine weniger als 30% Inhibition bewirkt, wirkt prophylaktisch gegen Nervenkampfstoffe, im Gegensatz dazu kommt es bei mehr als 30%iger Inhibition zu einer Verbesserung der Penetration von DEET und Permethrin ins ZNS, die dort ihrerseits Schäden hervorrufen können.

Insgesamt gab es 4 Untersuchungen von ehemaligen Golfkriegsteilnehmern, von denen bis zu 70% an ernsthaften gesundheitlichen Problemen litten, die sich in einem breiten Spektrum von peripheren und zentralen Nervenschäden äußerten. Insgesamt konnten sechs verschiedene Symptomenkomplexe festgehalten werden, die von mentalen Störungen bis zur Inkontinenz und Fieber reichen.

Die differentialdiagnostischen Überlegungen zu den möglichen Ursachen für die aufgeführten Symptome beinhalten ein breites Spektrum, das von Infektionen bis zur Exposition gegenüber Chemikalien, Medikamenten, biologischen und chemischen Kampfstoffen, psychologischen Stressoren, kriegsunabhängigenErkrankungen bis zur schlichten Simulation reicht.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse wurde eine Schädigung durch neurotoxische Substanzen, die eine Hemmung der Cholesterinesterase verursachen, als wahrscheinlichste Ursache erachtet. Dies weist laut Ansicht der Autoren mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen Einsatz von chemischen Kampfstoffen im Kriegsgebiet hin, eine fehlerhaft durchgeführte medikamentöse Prophylaxe wird als weniger wahrscheinlich erachtet [2].

Gegenteilige Meinungen schuldigen die erhöhte psychische Belastung im Sinne einer „posttraumatischen Stressreaktion“ an [83].

Letztlich stellte ein Vertreter des Gesundheitministeriums der USA (J.Roberts) fest, daß es trotz der intensiven Forschung keine Beweise dafür gebe, daß die Ursache der Erkrankungen in einer Exposition gegenüber chemischen oder biologischen Kampfstoffen zu suchen sei [108].

Darüberhinaus gelangten einige Forscher zu der Erkenntnis, daß die gefundenen Symptome und Diagnosen denen der normalen US Bevölkerung entsprechen und es kein sogenanntes Golfkriegssyndrom gebe [87, 91]. Die im Golfkrieg aufgetretenen Todesfälle wären zudem typisch für US Militärangehörige und nicht ungeklärt [108, 157].
Auch ein vermehrtes Auftreten von Krebserkrankungen konnte nicht festgestellt werden [41].

Im Gegensatz zu den Forschern, die den Zusammenhang zwischen der Schadstoffexposition und dem Auftreten des Golfkriegssyndroms abstreiten, stehen die von uns in den Versuchen gewonnenen Erkenntnisse. Wir fanden ein erheblich erhöhtes genotoxisches Potential der Substanzkombinationen im Vergleich zu den Einzelsubstanzen. Diese Veränderung auf Zellebene sowie auch die bereits erwähnten Versuche an Hühnern, die bei Verabreichung der Kombination von DEET, Permethrin und Pyridostigminbromid deutliche nervale Schädigungen zeigten, machen auch eine Veränderung bzw. Schädigung auf organischer Ebene wahrscheinlich [90].
Die Forschergruppe um W. Haley an der Universität Texas unterstützt diese Erkenntnisse. Er fand heraus, daß die nervalen Schädigungen auf eine Kombination der Anti-Nervengas Tabletten Pyridostigminbromid, DEET in hochkonzentrierten Insektenrepellentien und Mückennetzen sowie der Exposition gegenüber Sprühinsektiziden zurückzuführen sind [49].

Darüberhinaus haben neueste Studien einen Genort (PON 1 Enzyme) gefunden, der für Enzympolymorphismen verantwortlich sein soll und eine mögliche Erklärung liefern könnte, warum einige Soldaten schwerste neurologische Ausfälle erlitten, während andere lange Zeit symptomlos blieben [2, 49, 50, 93].

Landrigan beschreibt in seinem Artikel „Illness in Gulf War veterans“ ebenfalls die von Haley gefundenen Ergebnisse. Haley beobachtete laut Landrigan Marinesoldaten im Golfkrieg, die natürlich anderen Belastungen ausgesetzt waren als die übrigen Soldaten im Golfkrieg. Dieser Aspekt vergrößert einerseits die Bedeutung dieser Studie, verhindert andererseits aber die Verallgemeinerung der gefundenen Ergebnisse. Außerdem nahmen nur 41% des Batallions an den Untersuchungen teil und darüber hinaus beruhen praktisch alle Informationen über Krankheitssymptome auf Selbstbeobachtung.
Detaillierte klinische und neuropsychologische Untersuchungen wurden nur an 23 symptomatischen Patienten durchgeführt, was weniger als 4% des Bataillons entspricht. Außerdem wurde, so Landrigan, die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit, ein klassischer Test zum Nachweis einer Belastung durch Organophosphate, nur an 5 Soldaten durchgeführt. Nicht desto trotz verlangen die von Haley et al. gefundenen Ergebnisse ernsthafte Untersuchungen nach den Wirkungen, Nebenwirkungen und Wechselwirkungen der verwendeten Substanzen [73].

Insgesamt gelangten wir in der vorliegenden Arbeit zu der Erkenntnis, dass der Einsatz der Kombinationen von DEET, Permethrin und Pyridostigminbromid zu einer Erhöhung der Genotoxizität auf Zellebene im Vergleich zu den Einzelsubstanzen führt. Weitere Untersuchungen, insbesondere an peripheren und zentralen Nervenzellen müssen nun zeigen, welche Relevanz diese Befunde haben.

4.2.12 Vergleich der Genotoxizität aller getesteten Substanzen

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Einzelsubstanzen wie Kombinationen getestet. Durch unterschiedliche Ausgangswerte der Lösungsmittelkontrollen und aufgrund unterschiedlich hoher Standardabweichungen kann ein direkter Vergleich aller Substanzen und aller Konzentrationen nur schwer erfolgen.
Hier wäre eine Testung mit mehr als den 5 Probanden pro Substanz erforderlich um eine geringere Standardabweichung der Mittelwerte und noch präzisere Ergebniswerte zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Durch den gezielten Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln ist heutzutage ein Lebensstandard möglich, der in der Landwirtschaft reiche Ernte garantiert, Haushalte frei von Schädlingen macht und einen hohen Hygienestand durch das Vernichten von Vektoren als mögliche Krankheitsüberträger garantiert.

Dies bringt für den einzelnen nichtgeschulten Anwender allerdings auch Risiken im Umgang mit den Mitteln selbst mit sich. Dabei spielen nicht nur die Aufnahme durch den Aerodigestivtrakt und über die Haut eine Rolle, sondern vor allem die möglichen gesundheitlichen Langzeitfolgen beim regelmäßigen Umgang mit Schädlingsbekämpfungsmitteln.

Der Untersuchung des genotoxischen Potentials der verwendeten Substanzen kommt hier große Bedeutung zu, da Veränderungen in der Desoxiribonukleinsäure (DNS) zu nachhaltigen Schäden führen können. Veränderungen in der DNS sind durchaus nicht ungewöhnlich und können, wenn der Körper die Fehler erkennt auch korrigiert werden. Geschieht dies nicht, kommt es zu bleibenden Fehlern in der Erbsubstanz. Wenn diese Fehler an entscheidenden Stellen im Genom vorliegen, können durch sie auch kanzerogene Erkrankungen induziert werden.

Sicher kann man aufgrund der Genotoxizität einer Substanz nicht automatisch auf deren kanzerogene Wirkung schließen. Epidemiologische Untersuchungen wie die Münchehagen Studie liefern jedoch erste Hinweise dafür, dass bei unprofessionellem Einsatz von Insektiziden im Haushalt auch das Auftreten von Leukämien häufiger ist.

Insektizide bringen einerseits hohen Lebensstandard, andererseits gefährden sie die Gesundheit. Sicher sollte ein Einsatz der „chemischen Keule“ nicht leichtsinnig und unkontrolliert erfolgen. Ein genereller Verzicht ist jedoch genauso wenig realisierbar. Unbewußt gehen wir täglich mit Insektiziden um. Studien ergaben, dass z.B. Permethrin in 2/3 aller Hausstaubproben nachweisbar ist. Dies ist u.a. durch Imprägnierung von Teppichböden mit Insektiziden wie Permethrin erklärbar. Doch auch in der Nahrungskette selbst lassen sich Rückstände von Permethrin und seinen Metaboliten nachweisen. Folglich tragen Insektizide zur Grundbelastung des Menschen mit chemischen Substanzen bei.

Hintergrund und Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des genotoxischen Potentials verschiedener Substanzen an humanen Lymphozyten. Dabei sollte nicht nur das Ausmaß der Schädigung durch die Einzelsubstanz getestet, sondern auch untersucht werden, ob die Kombination einzelner Substanzen (in diesem Falle DEET, Permethrin und Pyridostigminbromid) zu Veränderungen hinsichtlich des genotoxischen Potentials führt. Die dazu verwendete Methode war die Mikrogelelektrophorese und anschließende fluoreszentechnische Auswertung unter dem Mikroskop. Auf diese Weise konnten DNA Brüche nicht nur messtechnisch sondern auch visuell durch unterschiedliche Ausprägung der Komets dargestellt werden.

Die vorliegende Arbeit konnte eindeutige Hinweise dafür liefern, daß eine Exposition von humanen Lymphozyten mit den untersuchten Substanzen eine genotoxische Wirkung hervorruft, die bei den Kombinationssubstanzen noch ausgeprägter war.

Weitere Untersuchungen müssen nun klären, welche epidemiologische Relevanz diese Ergebnisse haben und welche Substanzen langfristig den besten Nutzen-Wirkungseffekt aufweisen.

6 Literatur

1. Abou-Donia MB, Wilmarth KR., Jensen KF, Oehme FW, Kurt TL: Neurotoxicity resulting from coexposure to pyridostigminebromid, DEET and permethrin: implications of gulf war chemical exposures. J Toxicol Environ Health 48: 35-56 (1996)

2. ACC: Gibt es ein Golfkriegssyndrom? Dtsch Arztebl 94: 45 (1997)

3. Adler T: Desert storm´s medical quandary: do Iraqi chemical and biological agents explain Gulf War syndrome? Sci News 145: 394-395 (1994)

4. Aldrige WN: An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 21: 89-104 (1990)

5. Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Browne MA: The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): Messurement of tail length and moment. Mutagenesis 10: 85-90 (1995)

6. Barrueco C, Herrera A, Caballo C, de la Peña E: Cytogenetic effects of permethrin in cultured human lymphocytes. Mutagenesis 7: 433-437 (1992)

7. Barrueco C, Herrera A., Caballo C, de la Peña E: Induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and cho cells by Permethrin. Teratog Carcinog Mutagen 14: 31-38 (1994)

8. Bauchinger M, Dresp J, Schmid E, Hauf R: Chromosome changes in lymphocytes after occupational exposure to pentachlorophenol (PCP). Mutat Res 102: 83-88 (1982)

9. BAYER AG Sicherheitsdatenblatt nach EU Richtlinien. Consumer Care 342908/06: 1-5 (1998)

10. Baynes RE, Halling KB, Riviere JE: The influence of DEET on the percutaneus absorption of permethrin and carbaryl. Toxicol Appl Pharmacol 144: 332-339 (1997)

11. Berkson J: Patient statement: a canary´s tale. Toxicol Ind Health 10: 323-326 (1994)

12. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R: Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. Mutat Res 343: 201-207 (1995)

13. Bhunya SP, Jena GB: Genotoxic potential of the organchlorine insecticide lindane (gamma-BHC): an in-vivo study in chicks. Mutat Res 272: 175-181 (1992)

14. Blasiak J, Jaloszynski P, Trzeciak A, Szyfter K: In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and ist two analogues. Mutat Res 445: 275-283 (1999)

15. Börner H: Allgemeiner Pflanzenschutz. In: Börner H (Hrsg) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 7. Aufl, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, S. 77-79 (1997)

16. Bonsall JL, Turnbull GJ: Extrapolation from safety data to management of poisoning with reference to amitraz (a formamidine pesticide) and xylene. Human Toxicol 2: 587-592 (1983)

17. von Bruchhausen F, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackethal E, Holzgrabe U: Phenothrin. In: von Bruchhausen F, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackethal E, Holzgrabe U (Hrsg.): Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis Bd 9 Stoffe P-Z, 5. Aufl, Springer Verlag: S. 139-140 (1992)

18. Buchholz BA, Pawley NH, Vogel JS and Mauthe RJ: Pyrethroid Decrease in central nervous system from nerve agent pretreatment. J Appl Toxicol 17: 231-234 (1997)

19. Buschfort C, Müller MR, Seeber S, Rajewsky MF, Thomale J: DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. Canc Res 57: 651-658 (1997)

20. Butler WH, Gabriel KL, Preiss FJ, Osimitz TG: Lack of genotoxicity of piperonyl butoxide. Mutat Res 371: 249-258 (1996)

21. Butte W, Kemper K: A spectophotometric assay for pyrethroid cleaving enzymes in human serum. Toxicol Lett 107: 49-53 (1999)

22. Butte W, Walker G, Heinzow B:
Referenzwerte der Konzentration von Permethrin-Metaboliten C12CA [3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure] und 3-PBA[3-Phenoxybenzoesäure] im Urin. Umweltmed Forsch Prax 3: 21-26 (1998)

23. Cantor KP, Blair A, Everett G, Gibson R., Burmeister LF, Brown LM, Schuman L, Dick FR: Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin´s lymphoma among men in Iowa and Minnesota. Cancer Res 52: 2447-2455 (1992)

24. Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, Lawrence LJ: Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. Annu Rev Pharmacol Toxicol 23: 413-438 (1983)

25. Centers for disease control and prevention: Unexpected illness amoung Persian Gulf War veterans in an air National Guard unit: preleminary report. JAMA 274: 16-17 (1995)

26. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R: The comet assay: what can it really tell us? Mutat Res 375: 183-193 (1997)

27. Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ: The kinetic of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. Mutat Res 336: 69-77 (1995)

28. Cook JE, Wenger CB, Kolka MA: Chronic pyridostigmine bromide administration: Side effects amoung soldiers working in a desert environment. Mil Med 157: 250-254 (1992)

29. Cramer HH: Pflanzenschutz und Welternte. In: Pflanzenschutz Nachrichten Bayer AG 20: 3-523 (1967)

30. Davies PB: An investigation into the possible induction of mutations at the HGPRT-Locus of Chinese hamster ovary cells by „Insect Repellent 3535“. TNO, Delft, Study No. CL 82/144 (1982)

31. Degraeve N, Chollet MC, Moutschen J: Cytogenetic and genetic effects of subchronic treatment with organophosphorus insecticides. Arch Toxicol 56: 66-67 (1984)

32. Degraeve N, Moutschen J: Genetic and cytogenetic effects induced in the mouse by an organophosphorus insecticide: malathion. Environ Res 34: 170-174 (1984)

33. Dorman DC: Diethyltoluamid (DEET) Insect Repellent Toxicosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 20: 387-391 (1990)

34. Ehrlich G, Ginzberg D, Loewenstein Y, Glick D, Kerem B, Ben-ari S, Zakut H, Soreq H: Population diversity and distinct haplotype frequencies associated with AChE and BChE genes of Israeli Jews from trans-caucasian Georgia and from Europe. Genomics 22: 288-295 (1994)

35. Eiermann B, Sommer N, Winne D, Schumm F, Maier U, Breyer-Pfaff U: Renal clearence of pyridostigmine in myasthenic patients and volunteers under the influence of ranitidine and pirenzepine. Xenobiotica 23: 1263-1275 (1993)

36. El-Toukhy MA, Ebied SA, Hassan AA, El-Sewedy SM: In vivo studies on the effect of some insecticides on the hepatic activities of l-tryptophan 2,3-dioxygenase and pyridoxal phosphokinase of male mice. J Environ Sci Health B 24: 265-276 (1989)

37. Fairbairn DW, Olive PL, O´Neill KL: The comet assay. A comprehensive review. Mutat Res 339: 37-59 (1995)

38. Ficarra BJ: Disputada. Medical Mystery: Gulf war syndrome. J Med 26: 87-94 (1995)

39. Figa-Talamanca I, Mearelli I, Valente P: Mortality in a cohort of pesticide applicators in an urban setting. Int J Epidemiol 22: 674-676 (1993)

40. Flessel P, Qintana PJ, Hooper K: Genetic toxicity of malathion: a review. Environ Mol Mutagen 22: 7-17 (1993)

41. Fortini P, Raspaglio G, Falchi M, Dogliotti E: Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. Mutagen 11: 169-175 (1996)

40. Fuchs MEA, Faulde M: Präparate für Krisenreaktionskräfte. In: Fuchs MEA, Faulde M (Hrsg), Kompedium der Schädlingsbekämpfung, Schriftenreihe Präventivmedizin, PM6, Bundesministerium der Verteidigung, Referat Hygiene, Arbeits-, Umweltmedizin, S. 267 (1997)

41. Fumento M: What is gulf war syndrome? American spectator: 28-34 (1995)

42. Garry VF, Nelson RL, Griffith J, Harkins ME: Preparation for human study of pesticide applicators: sister chromatide exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigants. Teratog Carcinog Mutagen 10: 21-29 (1990)

43. Gaughau LC, Robinson RA, Casida JE: Distribution and metabolic fate of trans- and cis-permethrin in lactating jersey cows. J Agric Food Chem 26: 613-618 (1978)

44. Gedik CM, Ewen SW, Collins AR: Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. Int J Rad Biol 62: 313-320 (1992)

45. Gilot-Delhalle J, Colizzi A, Moutschen J, Moutschen-Dahmen M: Mutagenicity of some organophosphor compounds at the ades locus of Schizosaccharomyces pombe. Teratog Carcinog Mutagen 117: 139-148 (1983)

46. Glickman AH, Weitman SD, Lech JJ: Different toxicity of trans-Permethrin in rainbow trout et mice. I. Role of biotransformation, Toxicol Appl Pharmacol 66: 153-161 (1982)

47. Goedicke HJ, Hermes H, Wagner R: Exposition durch Rückstände auf Pflanzenoberflächen nach Anwendung von Pflanzenschutzmitteln im Gewächshaus. Zeitschrift für die gesamte Hygiene und ihre Grenzgebiete 35: 531-533 (1989)

48. Gwinn MR, Whipkey DL, Tennant LB, Weston A: Differential gene expression in normal human mammary epithelial cells treated with malathion monitored by DNA microarrays. Environ Health Perspect 113: 1046-1051 (2005)

49. Haley RW: Self-reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the gulf war – A cross-sectional epidemiologic study. JAMA 277: 231-237 (1997)

50. Haley RW, Hom J, Roland PS, Bryan WW, van Ness PC, Bonte FJ, Devous MD, Mathews D, Fleckenstein JL, Wians FH, Wolfe GI, Kurt TL: Evaluation of neurologic function in Gulf war veterans, A blinded case-control study. JAMA 277, 223-230 (1997)

51. Haley RW, Kurt ThL, Hom J: Is there a Gulf War Syndrome? JAMA 277: 215-222 (1997)

52. Harvey, PW; Cockburn, A; Davies, WW: Amitraz poisoning in humans. J Toxicol Clin Toxicol 37: 513-514 (1999)

53. Haustein UF: Pyrethrine und Pyrethroide (Permethrin) bei der Behandlung von Skabies und Pediculosis. Der Hautarzt 42: 9-15 (1991)

54. Helbig R, Speit G: DNA effects in repair-deficient V79 Chinese hamster cells studied with the comet assay. Mutat Res 377: 279-286 (1997)

55. Herath JF, Jala SM, Ebert MJ, Martsolf JT: Genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion based on human lymphocyte in culture. Cytologia 54: 191-195 (1989)

56. Herrera A, Barrueco C, Caballo C, de la Peña E: Effect of Permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. Environ Mol Mutagen 20: 218-222 (1992)

57. Hoellinger H, Lecorsier A, Sonnier M, Leger C, Do-Cao-Thang, Nguyen-Hoang-Nam: Cytotoxicity, cytogenotoxicity and allergenicity tests on certain pyrethroids. Drug Chem Toxicol 10: 291-310 (1987)

58. Hongchun Qui, Won Jun H, McCall JW: Pharmacokinetics, formulation, and safety of insect repellent N,N-diethyl-3-methylbenzamid (DEET): a review. J Am Mosq Control Assoc 14: 12-27 (1998)

59. Hoy JB, Cornell JA, Karlix JL, Tebbett IR., van Haaren F: Repeated coadministration of Pyridostigmine Bromide, DEET, and Permethrin alter locomotor behavior of rats. Vet Hum Toxicol 42: 72-76 (2000)

60. IARC: Permethrin. In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 53, S. 329-349 (1991)

61. Ila HB, Topaktas M, Rencuzogullari E, Kayraldiz A, Donbak L, Daglioglu YK: Genotoxic potential of cyfluthrin. Mutat Res 656: 49-54 (2008)

62. Industrieverband Agrar: Wirkstoffe in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln. Physikalisch–chemische und toxikologische Daten, S. 37-39 (2000)

63. Institute of medicine: Health consequences of service during the Persian Gulf War: Initial findings and recommendations for intermediate action. Washington DC: National Academy Press (1995)

64. Jorens PhG, Zandijk E: An unusual poisoning with the unusual pesticide amitraz. Human & Experimental Toxicology, Stockton Press 16: 600-601 (1997)

65. Kalow W, Davis RO: The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. Biochem Pharmacol 1: 183-192 (1958)

66. Kalow W, Marton A: Second-generation toxicity of malathion in rats. Nature 192: 464-465 (1961)

67. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Anström G: The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutat Res 363: 89-96 (1996)

68. Klein RG, Schmezer P, Hermann R, Waas P, Spiegelhalder B, Bartsch H: Strong nasal carcinogenicity and genotoxicity of 1-nitroso-4-methylpiperazine after low dose inhalation in rats. Carcinogenesis 20: 1629-1631 (1992)

69. Komission B 7: Monographie Diethyltoluamid. Banz-Nr. 137: 1-3 (1994)

70. Koplovitz I, Harris LW, Anderson DR, Lennox WJ, Stewart JR: Reduction by pyridostigmine pretreatment of the efficacy of atropine and 2-PAM treatment of sarin and UX poisoning in rodents. Fund Appl Toxicol 18: 102-106 (1992)

71. Kramer PJ: Trial in vitro for mutagenic potential in bacteria with and without addition of a metabolizing system. E. Merck Institute of toxicology, Study No. 4/141/80 (1980)

72. Kuchenmeister F: Etablierung und Erprobung einer Technik, die es erlaubt, DNA Schäden an einzelnen Nasenschleimhautzellen der Ratte und des Menschen nachzuweisen. Med Dissertation, Universität Heidelberg (1994)

73. Landrigan PJ: Illness in Gulf War veterans: Causes and Consequences. JAMA 277: 259-261(1997)

74. Leng G: Neue Erkenntnisse über Toxikologie und Metabolismus von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln. Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin 33: 212-218 (1998)

75. Leng G, Lewalter J, Röhring B, Idel H: The influence of individual susceptibility in pyrethroid exposure. Toxicol Lett 107: 123-130 (1999)

76. Leung VK, Chan TY, Yeung VT, Amitraz poisoning in humans. J Toxicol Clin Toxicol 37: 513-514 (1999)

77. Lipkowitz S, Garry VF, Kirsch IR: Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. Proc Nat Acad Sci 89: 5301-5305 (1992)

78. Maibach HI, Akers WA, Johnson HL, Khan AA, Skinner WA: Topical insect repellents. Clin Pharmacol Ther 16: 970-973 (1974)

79. Maibach HI, Kahn AA, Akers WA: Use of insect repellents for maximum efficiacy. Arch Dermatol 109: 32-35 (1974)

80. Maibach HI, Skinner WA, Strauss WG, Khan AA: Factors that attract and repel mosquitos in human skin. JAMA 196: 263-266 (1966)

81. Marinovich M, Ghilardi F, Galli CL: Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: comparison with single pesticides. Toxicology 108: 201-206 (1996)

82. Martin FL, Cole KJ, Orme MH, Grover PL, Phillips DH, Venitt S: The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis („Comet“) assay in the metabolically-competent MCL-5 cells. Mutat Res 445: 21-43 (1999)

83. Marx C: „Multiple chemical sensitivity“: Keine gesicherten wissenschaftlichen Daten für einen exakten Nachweis des Krankheitsbildes. Dtsch Arztebl 96: 1499 (1999)

84. Mayer K: Der Pflanzenschutz vom Altertum bis zur Gegenwart. In: Mayer K (Hrsg), 4500 Jahre Pflanzenschutz: Zeittafel zur Geschichte des Pflanzenschutzes und der Schädlingsbekämpfung unter besonderer

Berücksichtigung der Verhältnisse in Deutschland, Verlag E. Ulmer, Stuttgart (1959)

85. Mc Cain WC, Lee R, Johnson MS, Whaley JW, Ferguson PB, Leach Glenn: Acute oral toxicity study of pyridostigminebromid, permethrin and DEET in the laboratory rat. J Toxicol Environ Health 50: 113-124 (1997)

86. McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames B: Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. Proc Natl Acad Sci 72: 5135-5139 (1975)

87. McCarthy M: US study finds no Gulf War syndrome. Lancet 346: 434 (1995)

88. McCorkel F, Taylor R, Martin D, Glick B: The effect of Permethrin on the immune response of chickens. Poultry Sci 59: 1568 (1980)

89. McGuire MC, Nogueira CP, Bartels CF, Lightstone H, Hajra A, Van der Spek AF, Lockridge O, and La Du BN: Identification of the structural mutation responsible for the dibucain-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. Proc Natl Acad Sci 86: 953-957 (1989)

90. Meehan SK: The search for solutions: veterinarians explore causes of the Gulf war syndrome. J Am Vet Med Assoc 208: 1945-1946 (1996)

91. Milner IB, Axelrod BN: Is there a gulf war syndrome? JAMA 271: 661 (1994)

92. Mohn G: 5-methyltryptophan resistance mutations in Eschericia coli K-12: mutagenic activity of monofunctional alkylating agents including organophosphorus insecticides. Mutat Res 20: 7-15 (1973)

93. Morbidity and mortaly weekly report (MMWR): US Department of Health and Human services, Unexplained illness among Persian Gulf veterans in an Air National Guard Unit: preliminary report. Morbidity and Mortality weekly report 44: 443-447 (1995)

94. Mount GA, Snoddy EL: Pressurized sprays of permethrin and DEET on clothing for personal protection against the lone star tick and the American dog tick (Acari: Ixodidae). J Econ Entomol 76: 529-531 (1983)

95. Neville LF, Gnatt A, Loewenstein Y, Seidman S, Ehrlich G, Soreq H: Intramolecular relationship in cholinesterases revealed by oocyte expression of site-directed and natural variants of human BchE. EMBO J 11: 1641-1649 (1992)

96. Nicolas A, Vienne M, van de Berghe H: Induction of sister-chromatid exchanges in cultured human cells by organophosphorus insecticide: malathion. Mutat Res 67: 167-172 (1979)

97. Östling O, Johanson KJ: Mikrogelelectrophoresis study of radiation induced DNA-damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 123: 291-298 (1984)

96. Olive PL, Banath JP, Durand RE: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the „comet“ assay. Radiat Res 122: 86-94 (1990)

97. Osano O, Admiraal W, Klamer HJ, Pastor D, Bleeker EA: Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on Vibrio fischeri and Chironomus riparius. Environ Pollut 119: 195-202 (2002)

98. Pennisi E: Chemicals behind the gulf war syndrome? Science 26: 479-480 (1996)

99. Perger G: Erkrankungen der Leber durch berufliche Exposition gegenüber Pestiziden. Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed 33: 548-556 (1998)

100. Perger G, Szadkowski D: Wirkungsweise und Toxikologie von Pyrethroiden mit besonderer Berücksichtigung des berufsbedingten Expositionsriskios. Dtsch Arztebl 91: 37 (1994)

101. Perkow W, Ploss H: Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. Loseblattausgabe, 3. Aufl, Blackwell Wissenschaftlicher-Verlag (1993)

102. Philipp GJ, Zandijk E: An unusual poisoning with the unusual pesticide amitraz. Human & Experimental Toxicology 16: 600-601(1997)

103. Phillips H J: Dye exclusion test for cell viability. In: Kruse P F (Hrsg) Tissue culture. 1. Aufl, Academic Press, S.407-408 (1973)

104. Pluijmen M, Drevon C, Montesano R, Malaveille Ch, Hautefeuille A, Bartsch H: Lack of mutagenicity of synthetic pyrethroids in Salmonella typhimurium strains and in V79 Chinese hamster cells. Mutat Res 137: 7-15 (1984)

105. Pluth JM, Nicklas JA, O´Neill JP, Albertini RJ: Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. Cancer Res 56: 2393-2399 (1996)

106. Pool-Zobel BL, Brendler SY, Liegibel UM, Tompa A, Schmezer P: Employment of adult mammalian primary cells in toxicology: in vivo and in vitro genotoxic effects of environmentally significant N-nitrosodialkylamines in cells of the liver, lung and kidney. Environ Mol Mutagen 15: 24-35 (1990)

107. Pool-Zobel BL, Guigas C, Klein R, Neudecker Ch, Renner HW, Schmezer P: Assesment of genotoxic effects by lindane. Food Chem Toxicol 31: 271-283 (1993)

108. Roberts J: Chemical weapons did not cause the Gulf war syndrome. BMJ 310: 692 (1995)

109. Rojas E, Lopez MC, Valverde M: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J Chromat B 722: 225-254 (1999)

110. Samsonov YN, Makarov VI: Kinetics and photophysical mechanism of sunlight photolysis of unstable resmethrin and phenothrin in aerosols and thin films. Bull Environ Contam Toxicol 56: 903-910 (1996)

111. Schreck CE, Haile DG, Kline DL: The effectiveness of Permethrin and DEET, alone or in combination , for protecting against aedes taeniorhynichus. Am J Trop Med Hyg 33: 725-730 (1984)

112. Schreck CE, Kline DL: Personal protection afforded by controlled-release topical repellents and permethrin-treated clothing against natural population of aedes taeniorhynichus. J Am Mosq Control Assoc 5: 77-80 (1989)

113. Schreck CE, Mount GA, Carlson DA: Pressurized sprays of Permethrin on clothing for personal protection against the lone star tick. J Econ Entomol 75: 1059-1061 (1982)

114. Schreck CE, Posey K., Smith D: Durability of Permethrin as a potential clothing treatment to protect against blood feeding antropods.
J Econ Entomol 71: 397-400 (1978)

115. Schreck CE, Snoddy EL, Mount GA: Permethrin and repellents as clothing impregnants for protection from the lone star tick. J Econ Entomol 73: 436-439 (1980)

116. Schulz J, Schmoldt A, Schulz M: Pyrethroide: Chemie und Toxikologie einer Insektizidgruppe. Pharmazeutische Zeitung 15: 1141-1156 (1993)

117. Selim S, Hartnagel Jr. RE, Osimitz TG, Gabriel KL, Schoenig GP: Absorption, metabolism, and excretion of N,N-diethyl-m-tobiamide following dermal application to human volunteers. Fund Appl Toxicol 25: 95-100 (1995)

118. Sepulcri F, Angehrn W, Wolf C: Schwere Intoxikation mit einem Cholinesterasehemmer. Schweizer medizinische Wochenschrift 117: 487-490 (1987)

119. Shiloff JD, Clement JD: Effects of subchronic pyridostigmin pretreatment on the toxicity of soman. Can J Physicol Pharmacol 64: 1047-1049 (1986)

120. Shirasu Y, Moriya M, Furuhashi A, Kada T: Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. Mutat Res 40: 19-30 (1976)

121. Singh NP: Sodium ascorbate induces DNA single strand breaks in human cells in vitro. Mutat Res 375: 195-203 (1997)

122. Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175: 184-191 (1988)

123. Skinner WA, Tong H, Johnson H, Maibach H, Skidmore D: Human sweat components – attractacy and repellency to mosquitos. Experientia 24: 679-680 (1968)

124. Skinner WA, Tong H, Johnson H, Parkhurst RM, Thomas D, Spencer T, Arkers W, Skidmore D, Maibach H: Influence of skin surface lipids on protection time of topical mosquito repellent. J Pharm Sci 66: 1764-1766, (1977)

125. Skinner WA, Tong HC, Pearson TR, Maibach HI: Repellency of human skin-surface lipid hydrocarbons to the yellow fever mosquito. J Econ Entomol 60: 927-929 (1967)

126. Skinner WA, Tong HC, Maibach H, Khan AA, Pearson T: Repellency of skin-surface lipids of humans to mosquitos. Science 149: 305-306 (1965)

127. Skinner WA, Tong HC, Pearson T, Strauss W, Maibach HI: Human sweat components attractive to mosquitos. Nature 207: 661-662 (1965)

128. Slamenova D, Gabelova A, Ruzekova L, Chalupa I, Horvathova E, Farkosova T, Bozsakoyova E, Stetina R: Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding

technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. Mutat Res 383: 243-252 (1997)

129. Sobti RC, Krishan A, Pfaffenberger CD: Cytokinetic and cytogenic of some agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro: organophosphates. Mutat Res 102: 89-102 (1989)

130. Speit G, Hanelt S, Helbig R, Seidel A, Hartmann A: Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. Toxicol Lett 88: 91-98 (1996)

131. Speit G, Hartmann A: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods Mol Biol 314: 275-286 (2006)

132. Speit G, Hartmann A: The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). Mutagen 10: 555-559 (1995)

133. Stelzer KJ, Gordon MA: Effects of pyrethroids on lymphocyte mitogenetic responsiveness. Res Common Chem Pathol Pharmacol 46: 137-150 (1984)

134. Surralés J, Xamena N, Creu, A, Catalán J, Norppa H, Marcos R: Induction of micronuclei by five pyrethroid insectides in whole blood and isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res 341: 169-184 (1995)

135. Tennant R, Margolin B, Shelby M, Zeiger E, Haseman JK, Spalding J: Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. Science 236: 933-941 (1987)

136. The Iowa Persian Gulf Study Group: Self-reported illness and health status among Gulf war veterans, A population based study. JAMA 277: 238-245 (1997)

137. Tice RR, Andrews PW, Singh NP: The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. Basic Life Sci 53: 291-301 (1990)

138. Tisch M, Faulde M, Maier H: Genotoxic effects of insecticides in current use on mucosal epithelial cells from human tonsil tissue. HNO 55: 15-22 (2007)

139. Tisch M, Faulde M, Maier H: Genotoxic effects of pentachlorophenol, lindane, transfluthrin, cyfluthrin, and natural pyrethrum on human mucosal cells of the inferior and middle nasal conchae. AM J Rhinol 19: 141-151 (2005)

140. Tisch M, Lohmeier A, Schmezer P, Bartsch H, Maier H: Genotoxische Wirkung der Insektizide Pentachlorphenol und Lindan auf menschliche Nasenschleimhautepithelien. Dtsch Med Wochenschr 126: 840-844 (2001)

141. Tisch M, Schmezer P, Faulde M, Groh A, Maier H: Genotoxicity studies of permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. Eur Arch Otorhinolaryngol 259: 150-153 (2002)

142. Tisch M, Genotoxische Effekte von Insektiziden und Repellentien auf Zellen des oberen Aerodigestivtraktes des Menschen. Habilitationsschrift, Universität Heidelberg (2004)

143. Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio AM, Smith MT: Genotoxicity of Malathion in human lymphocytes assessed using a micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion exposed workers. Mutat Res 388: 85-95 (1997)

144. Umetsu N, Grose FH, Allahyari R, Abu-El-Haj S, Fukuto TR: Effekt of impurities on mamalian toxicity of technical malathion and acephate. J Agric Food Chem 25: 946-953 (1977)

145. Van Bao T, Szabo I, Ruzicska P, Czeizel A: Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication. Humangenetik 24: 33-57 (1974)

146. Viby-Mogensen J: Succinylcholine neuromuscular blockade in subjects heterozygous for abnormal plasma cholinesterase. Anaesthesiology 55: 429-434 (1981)

147. Vijverberg, HP, van den Bercken J: Neurotoxical effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. Crit Rev Toxicol 21: 105-126 (1990)

148. Voigt Th: Insektenabwehr: Schutz vor Mücken und Moskitos. Dtsch Arztebl 95: 30 (1998)

149. Waldhauer W: Wirkstoffe von Pflanzenschutzmitteln. In: von Bruchhausen F, Ebel S, Frahm AW, Hackethal E, Hänsel R, Keller K, Nürnberg

E, Rimpler H, Surmann P, Wolf HU, Wurm G (Hrsg), Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Bd 1 Waren und Dienste, 5. Aufl, Springer Verlag, S. 346 (1992)

150. Walter Z, Czajkowska A, Lipecka K: Effect of malathion on the genetic material of human lymphocytes simulated by phytohaemagglutinin (PHA). Hum Genet 53: 357-381 (1980)

151. Waters M, Sandu S, Simmon V, Mortelmans KE, Mitchell AP: Study of pesticide genotoxicity. Basic Life Sci 21: 275-326 (1982)

152. de Weille JR, Vijverberg HP, Narahashi T: Interactions of pyrethroids and octylguanidine with sodium channels of squid giant axons. Brain Research 445: 1-11 (1988)

153. WHO 1990: Permethrin. Environmental Health Criteria 94, Geneva (1990)

154. Wild D: Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. Mutat Res 32: 133-150 (1975)

155. Williams FM: Clinical significance of esterase in man.
Clin Pharmacokinet 10: 392-403 (1987)

156. Wong P, Wai C, Liong E: Comparative study on mutagenicities of organophosphorus insecticides in Salmonella. Chemosphere 18: 2413-2422 (1989)

157. Writer JV, DeFraites RF, Brundage JF: Comparative mortality amoung US military personnel in the Persian Gulf region and worldwide during operations Desert Shield and Desert Storm. JAMA 275: 118-121 (1996)

158. Yoder J, Watson M, Benson WW: Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. Mutat Res 21: 335-340 (1973)

159. Young GD: Safety and efficacy of DEET and Permethrin in the prevention of arthropod attack. Mil Med 163: 324-330 (1998)

Danksagung

„Wenn du ein großes Ziel vor Augen hast, eine außerordentliche Tat, die du vollbringen willst, dann sprengen deine Gedanken alle Fesseln.
Dein Geist lässt alle Grenzen der Erfahrung hinter sich. Dein Bewusstsein weitet sich in alle Richtungen und mit einem Mal findest du dich in einer neuen, wunderbaren Welt wieder.
Schlummernde Kräfte, Gaben und Talente werden zum Leben erweckt, und du entdeckst, dass du weit mehr bist, als du je zu träumen wagtest."

(Patánjali)

Um mit Erfolg wissenschaftlich arbeiten zu können benötigt man gerade bei den „ersten Gehversuchen" helfende Hände, die einen stützen und einem Mut machen, sein Ziel zu verfolgen und nie aus den Augen zu verlieren. So wird Arbeiten letztlich auch von Erfolg gekrönt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Maier und seinem Oberarzt Professor Dr. Tisch für ihre Unterstützung ganz herzlich bedanken. Besonderer Dank gilt auch Frau Professor Dr. Kastl, die meine Arbeit korrekturgelesen und mir viele wertvolle Tips gegeben hat. Danke!

Besonderer Dank gilt meiner Familie:
- meinen Eltern, die mich zu dem gemacht haben, was ich heute bin, und in Krisenzeiten stets zu mir gehalten haben
- meinen Kindern, die wegen meines Berufs oft zurückstehen müssen

und all den Menschen, die mein Leben täglich bereichern und mich auf meinem Weg begleiten, es ist schön, dass es Euch gibt.

Lebenslauf

*	Geboren am 25. Juli 1974 in München	
*		Eltern: Vater: Dr. rer. nat. Bertold Beck, Apotheker und Lebensmittelchemiker Mutter: Heidi Beck, geborene Erhard, Chemotechnikerin
*	August 1981 – Juli 1985	Grundschule München-Laim
*	September 1985 – Dezember 1989	Gymnasium Maria Ward München-Nymphenburg
*	Januar 1990 – Mai 1994	Lessing-Gymnasium Neu-Ulm
*	Mai 1994	Abitur
*	01.07.1994	Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffiziersanwärter im Dienstgrad Sanitätssoldat beim Gebirgssanitätsbataillon in Kempten
*	bis 1.10.1995	Militärische Ausbildung
	9.01.1995	Beförderung zum Gefreiten OA
	3.07.1995	Beförderung zum Fahnenjunker
*	Oktober 1995 – Oktober 2004	Studium der Humanmedizin in Ulm
	15.04.1996	Beförderung zum Fähnrich
	27.04.1998	Beförderung zum Oberfähnrich
	27.04.1999	Beförderung zum Leutnant
*	14.08. 2002	Geburt der Tochter Julia Marie Sophie

* 22.01.2004	Abschluß des Studiums und Beförderung zum Stabsarzt
* Oktober 2004 – Oktober 2007	Truppenarzt in Donauwörth
* 26.04.2005	Geburt des Sohnes Martin Thomas Andreas
* 1.10.2007 – 30.09.2007	Staffelchef der Sanitätsstaffel Donauwörth
* Seit 1.10.2007	Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin