Vergleichende Untersuchungen zum teratogenen Potential von Detergentien und Retinol für die Entstehung von Wirbelsäulendefekten während der Embryogenese und Larvalentwicklung von *Brachydanio rerio* (HAM.-BUCH.) und *Xenopus laevis* (DAUDIN)

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Markus Schlomm
aus Werl

Göttingen 2006

D 7

Referent: **Prof. Dr. Ch. Podufal**

Korreferent: **Prof. Dr. R. Heinrich**

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhalt

1 Einleitung **1**
2 Material und Methoden **7**
2.1 Haltung und Zucht der Versuchstiere 7
2.1.1 Die Versuchstiere 7
2.1.1.1 *Brachydanio rerio* (HAM.-BUCH.) 7
2.1.1.2 *Xenopus laevis* (DAUDIN) 7
2.1.2 Die Ausgangszuchten 8
2.1.2.1 Die Zucht von *Brachydanio rerio* 8
2.1.2.2 Die Zucht von *Xenopus laevis* 8
2.1.3 Stimulation und Laichgewinnung 9
2.1.3.1 Laichgewinnung bei *Brachydanio rerio* 9
2.1.3.2 Laichgewinnung bei *Xenopus laevis* 10
2.2 Versuchsrahmenbedingungen 11
2.2.1 Analyse des verwendeten Wassers 11
2.3 Testsubstanzen 17
2.3.1 Waschmittel und Waschmittelinhaltsstoffe 17
2.3.1.1 Tenside 17
2.3.1.2 Chemischer Aufbau von Tensiden 18
2.3.1.3 Anionische Tenside 18
2.3.1.4 Kationische Tenside 19
2.3.1.5 Nichtionische Tenside 19
2.3.1.6 Wirkungsweise von Tensiden 20
2.3.1.7 Optische Aufheller und Bleichmittel 21
2.3.1.8 Bleichmittelaktivatoren 22
2.3.1.9 Enthärter und Komplexbildner 23
2.3.1.10 Enzyme 23
2.3.1.11 Lösungsmittel 24
2.3.1.12 Säuren 25
2.3.1.13 Sonstige Inhaltsstoffe 25
2.3.2 Testdetergentien 26
2.3.2.1 ARIEL 26
2.3.2.2 PERWOLL 27

2.3.3 Retinol ... 28
2.4 Toxikologische Tests ... 28
2.4.1 Konzentrationen ... 28
2.4.1.1 ARIEL ... 28
2.4.1.2 PERWOLL ... 29
2.4.1.3 Retinol ... 29
2.4.2 Die untersuchten Entwicklungsstadien ... 30
2.4.2.1 *Brachydanio rerio* ... 30
2.4.2.1.1 Entwicklungsstadium 10 ... 30
2.4.2.1.2 Entwicklungsstadium 12 ... 30
2.4.2.1.3 Entwicklungsstadium 16 ... 31
2.4.2.2 *Xenopus laevis* ... 31
2.4.3 Exposition ... 32
2.4.3.1 Exposition von *B.rerio*-Embryonen und –Larven ... 32
2.4.3.2 Exposition von *X.laevis*-Embryonen und –Larven ... 32
2.4.4 Toxikologische Auswertung ... 33
2.5 Untersuchung und Präparation von Embryonen und Jungtieren ... 34
2.5.1 Untersuchung lebender Embryonen und Jungtiere ... 34
2.5.2 Anfertigung von Totalpräparaten ... 35
2.5.2.1 Tötung und Fixierung ... 35
2.5.2.2 Färbungen ... 35
2.5.2.2.1 Mazeration und Aufhellung ... 35
2.5.2.2.2 Alizarinfärbung des Skeletts nach SPALTEHOLZ ... 35
2.5.3 Anfertigung von histologischen Präparaten ... 36
2.5.3.1 Fixierung, Entwässerung und Paraffinierung ... 36
2.5.3.2 Modifizierte Azan-Färbung nach HEIDENHAIN ... 38
3 Ergebnisse ... 40
3.1 Embryotoxikologische Versuche ... 40
3.1.1 Prozentuale Sterblichkeit ... 40
3.1.1.1 Untersuchungen zur Prozentualen Sterblichkeit nach 1-stündiger Exposition ... 41
3.1.1.2 Untersuchungen zur Prozentualen Sterblichkeit nach 24-stündiger Exposition ... 42
3.1.1.3 Vergleich der Prozentualen Sterblichkeiten bei unterschiedlichen Expositionszeiten ... 46
3.1.1.4 Vergleich der Prozentualen Sterblichkeiten verschiedener Entwicklungsstadien ... 47
3.1.1.5 Vergleich der Prozentualen Sterblichkeiten bei verschiedenen Waschmitteltypen ... 49

3.1.2 Letale Dosis (LD_{50}) ... 51
3.1.2.1 Vergleich der LD_{50}-Werte bei unterschiedlichen Expositionszeiten ... 51
3.1.2.2 Vergleich der LD_{50}-Werte verschiedener Entwicklungsstadien ... 52
3.1.3 Empfindlichkeitsbereiche ... 53
3.1.3.1 Vergleich der Empfindlichkeitsbereiche bei unterschiedlichen Expositionszeiten ... 54
3.1.3.2 Vergleich der Empfindlichkeitsbereiche verschiedener Entwicklungsstadien ... 54
3.1.4 Prozentualer Schlüpferfolg ... 55
3.1.4.1 Untersuchungen zum Prozentualen Schlüpferfolg nach 1-stündiger Exposition ... 55
3.1.4.2 Untersuchungen zum Prozentualen Schlüpferfolg nach 24-stündiger Exposition ... 56
3.1.4.3 Vergleich der Prozentualen Schlüpferfolge bei unterschiedlichen Expositionszeiten ... 59
3.1.4.4 Vergleich der Prozentualen Schlüpferfolge verschiedener Entwicklungsstadien ... 61
3.2 Makroskopische Untersuchung von Mißbildungen ... 63
3.2.1 Toxische Auswirkungen von Detergentien auf die Embryonal- und Larvalentwicklung von *B.rerio* ... 63
3.2.2 Untersuchungen zur Häufigkeit von Mißbildungen bei *B.*rerio ... 66
3.2.3 Untersuchung verschiedener Mißbildungstypen bei *B.rerio* ... 68
3.2.4 Untersuchung von Defekten der Wirbelsäule von *B.rerio* nach Detergentienexposition ... 70
3.2.4.1 Häufigkeit verschiedener Wirbelsäulendefekte bei *B.rerio* ... 70
3.2.4.2 Untersuchung von Mißbildungen des Achsenskeletts von *B.rerio* ... 72
3.2.4.2.1 Nanosomie ... 72
3.2.4.2.2 Kyphose ... 74
3.2.4.2.3 Lordose ... 78
3.2.4.2.4 Skoliose ... 82
3.2.5 Toxische Auswirkungen von Retinol auf die Embryonal- und Larvalentwicklung von *X.laevis* ... 85
3.2.6 Untersuchung von Defekten der Wirbelsäule von *X.*laevis nach Retinolexposition ... 86
3.2.6 Untersuchung von Wirbeldefekten bei *X.laevis* nach Retinolexposition ... 93
3.3 Cytologische Untersuchung von Mißbildungen bei *B.rerio* und *X.*laevis ... 101
4 Diskussion ... 112
4.1 Methoden in der toxikologischen Forschung ... 113
4.2 Toxizität von Waschmitteln und ihren Komponenten ... 115
4.3 Makroskopische Veränderungen am Embryo durch Detergentien und Retinol 120

4.4 Zelluläre Grundlage von Schädigungen durch Detergentien und Retinol 123
5 Zusammenfassung **130**
6 Literatur **131**
7 Anhang **145**
7.1 Abkürzungsverzeichnis 145
7.2 Abbildungsverzeichnis 146
7.3 Tabellenverzeichnis 150

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat sich die Aufmerksamkeit für Umweltgifte seitens der Medien und der Bevölkerung angesichts einer täglich wachsenden Anzahl neuer chemischer Substanzen erheblich verstärkt. Selten sind mit Chemikalien, die nach ihrer Erstsynthese in die Produktion gelangen, ausreichende Tests auf deren Verträglichkeit für Organismen und ihre mögliche Anreicherung in der Umwelt verknüpft.

Im Jahr 2000 wurden in Deutschland über 5.600 neue Wasch- und Reinigungsmittel oder neue Zusammensetzungen bestehender Marken in Verkehr gebracht. Dabei sind alle Produkte aus dem häuslichen, gewerblichen und industriellen Bereich berücksichtigt, die nach dem üblichen Gebrauch in Abwässer oder Gewässer gelangen können und deren Rahmenrezepturen dem Umweltbundesamt (UBA) nach dem Wasch- und Reinigungsmittelgesetz (WRMG) mitgeteilt werden müssen.

Die beim UBA erfaßten Mitteilungen zeigen, daß Ende 2000 insgesamt etwa 54.000 Wasch- und Reinigungsmittel von rund 4.500 Firmen auf dem deutschen Markt waren.

Über 800.000 Tonnen Waschmittel (inklusive Spezialwaschmittel und Weichspüler) werden jährlich in bundesdeutschen Haushalten zum Waschen verschiedenster Textilien verbraucht. Dabei gelangt der überwiegende Anteil zum Einsatz in der Haushaltswaschmaschine. (UBA 2004)

Verschiedene Waschmittelarten sind auf dem Markt, darunter herkömmliche Pulvervollwaschmittel, kompakte Vollwaschmittel, Baukastenwaschmittel, Color- und Buntwaschmittel und letztlich Flüssigwaschmittel wie die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Produkte ARIEL und PERWOLL. Die einzelnen Waschmitteltypen unterscheiden sich zum Teil beträchtlich in ihrer Umweltverträglichkeit.

Alle Waschmitteltypen stellen komplexe Stoffgemische dar und enthalten nach wie vor eine Vielzahl bedenklicher Substanzen der unterschiedlichsten chemischen Substanzklassen. Tenside und die sogenannten Builder (Gerüststoffe wie Zeolithe, Soda und Phosphate) stellen unter Mengenaspekten die wichtigsten Inhaltsstoffe dar.

Reinigungsmittel werden zwar zum überwiegenden Teil über die Abwasserkanalisation den Kläranlagen zugeführt und dort biologisch oder chemisch - soweit dies möglich ist - abgebaut (SCHARF et al. 1995), doch jedes Waschmittel enthält darüberhinaus Stoffe, die biologisch nicht oder nur unvollständig abbaubar sind. Daraus resultiert letztlich ihre Anreicherung in Umwelt oder Organismen und damit ihre ökotoxikologische Bedeutung.

Bor beispielsweise erweist sich als Problemsubstanz für das Grundwasser, da es in Form der in Waschmitteln enthaltenen Perborate in großen Mengen über das Abwasser in die Umwelt gelangt. Erhöhte Borwerte (SCHLEYER & KERNDORFF 1992) treten häufig in Gebieten mit hoher Besiedlungs- und Industrialisierungsdichte auf, weswegen Bor ein geeigneter Indikator für die anthropogene Beeinflussung von Grundwässern ist (Umweltdaten Brandenburg 2005).

In den letzten Jahrzehnten wurden die schwer abbaubaren Tetrapropylenbenzolsulfate (TPS) durch Tenside der linearen Alkylbenzolsulfonate (LAS) ersetzt. Diese Maßnahme führte zwar zu einer Reduktion der Schaumberge in den Flüssen, der aufgrund der grenzflächenaktiven Eigenschaften der LAS nach wie vor bestehende cytotoxische Einfluß auf tierische Zellen blieb dabei aber unbeachtet (STAHLSCHMIDT – ALLNER 1992; BUA-Stoffbericht 1997).

Tenside sind nicht nur quantitativ, sondern auch in ihrer Wirkung als eigentliche waschaktive Substanzen die chemischen Protagonisten eines Waschmittels, und damit für einen Großteil der toxischen Effekte von Detergentien verantwortlich. Nach längerem Kontakt vermögen Tenside die Permeabilität der Zellmembran zu verändern, was zu lytischen Erscheinungen oder zur Quellung der Zelle führt, wenn anionische und kationische Tenside mit den Zellmembranproteinen Adsorptionskomplexe bilden (BUA-Stoffbericht 1997). Auch zugesetzte Enzyme wie Proteasen, Lipasen und Amylasen können einen schädigenden Einfluß auf die Zellen haben.

Die Bewertung der Toxizität von Waschmitteln und anderen Stoffen auf das aquatische System erfordert eine Reihe von Tests unterschiedlicher Dauer an verschiedenen im Wasser lebenden Organismen. Nach dem Chemikaliengesetz (ChemG) und der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln nach dem Pflanzenschutzgesetz (PflSchG) müssen für Neuzulassungen Prüfberichte über die Gefährlichkeit der Stoffe für die Umwelt, d.h. auf terrestrische und aquatische Lebewesen vorgelegt werden (HEGER et al. 1998). Die EU-Testguidelines fordern verschiedene Testverfahren, wobei zur Ermittlung der aquatischen Toxizität die Auswirkungen auf Bakterien, Algen, Daphnien, Muscheln und mindestens 2 Fischarten (EU und OECD-Testrichtlinien) zu untersuchen sind. Akute Fischtests an erwachsenen Fischen wurden in den letzten Jahren durch cytotoxikologische Testmethoden und Untersuchungen an Fischembryonen ersetzt. Letztere haben im Vergleich zu jenen an adulten Tieren u.a. den Vorteil einer kürzeren Testzeit. Ferner können subletale Auswirkungen einer Testsubstanz beobachtet werden, die durch akute Fischtests nicht oder schwerer zu

erkennen sind (FUSSMANN & NAGEL 1997). Heute wirken auf die Fische meist mehrere Schadstoffe ein, sodaß die Erforschung subletaler Effekte zunehmend an Bedeutung gewinnt.

In der Arbeitsgruppe Insektenontogenese und Wirbeltierembryologie wurden in früheren Untersuchungen die Einflüsse verschiedener Chemikalien auf die Embryonalentwicklung des Zebrabärblings *Brachydanio rerio* (HAM.-BUCH.) untersucht, darunter Waschmittel (CONLEI, VISIR), Düngemittel (HINTZE-PODUFAL & VOGEL 1985), Glutamat, Zitronensäure, Formaldehyd und Bleinitrat (KNOPEK 1989). Hieraus, wie auch aus Untersuchungen mit diversen anderen Substanzen, hat sich ergeben, daß der Embryotest im Vergleich zum akuten Fischtest mit adulten Fischen erheblich empfindlicher ist (LANGE et al. 1995). Er hat sich ferner im Rahmen alternativer Testmethoden zur Ökotoxizität von Chemikalien als gleichwertig erwiesen und ist als solcher heute anerkannt (BUA-Stoffbericht 1997). Der Embryotest mit dem tropischen Zebrabärbling (DarT) wird als Modell zur Abschätzung ökotoxikologischer und toxikologischer Wirkungen in einer OECDE-Testguideline als Ersatz für den akuten Fischtest vorgeschlagen (NAGEL 2002).

B.rerio konnte sich für Toxizitätstests an Embryonen und Larven etablieren (u.a. SCHÄFERS & NAGEL 1993), da er über kurze Generationszeiten verfügt und das transparente Chorion des Embryos es zusätzlich ermöglicht, Zellteilungen und Organentwicklungen der Fische gut *in vivo* betrachten zu können (HERRMANN 1995), was für entwicklungsbiologische Untersuchungen sehr vorteilhaft ist. Der Zebrabärbling hat im letzten Jahrhundert auch große Bedeutung für genetische Untersuchungen erlangt (MONTE WESTERFIELD 1997; NÜSSLEIN-VOLHARD 1994; DOOLEY & ZON 2000) und wird mittlerweile für die mutagenetische und transgenetische Forschung verwendet.

Die Ontogenese von *B.rerio* vollzieht sich in für Teleostei typischer Weise in Form einer meroblastischen Furchung der telolecithalen Eier. Die Embryonalentwicklung des Zebrafisches wird üblicherweise nach HISAOKA & BATTLE (1958) und HISAOKA & FIRLIT (1960) in Stadien eingeteilt. Bei einer Wassertemperatur von 26°C vollzieht sich nach etwa vier Tagen die Schlüpfung der Larven. Diese erreichen nach weiteren vier bis sechs Wochen je nach Wassertemperatur und Nahrungsangebot das Stadium der Jungfische, in dem sie den adulten Zebrafischen zwar äußerlich ähneln, jedoch insgesamt kleiner und noch nicht geschlechtsreif sind (KNOPEK 1989). Die Zebrabärblinge erreichen nach etwa drei Monaten die Geschlechtsreife und eignen sich daher auch für Langzeituntersuchungen wie dem „Complete-life-cycle Test“

(BACHMANN 2002; NAGEL 1994).

Das Entwicklungsstadium, in dem sich der Embryo zum Zeitpunkt der Exposition befindet, ist neben den toxikologischen Parametern Konzentration und Expositionsdauer in teratologischen Versuchen der entscheidende Faktor. Die ersten 48 Stunden der Embryonalentwicklung beinhalten die wichtigsten Differenzierungsprozesse der Fische und wahrscheinlich die teratogenen Determinationsperioden der Wirbeltierentwicklung (BACHMANN 2002). Die Fortentwicklung während des Blastula- und Gastrulastadiums von *B.rerio* kann genau beobachtet werden. Da der Ablauf mittlerweile bekannt ist (HINTZE-PODUFAL & VOGEL 1985), kann der Grad eines Effektes vorrausgesehen werden. FISHER & HALPERN (1999) fanden an *B.rerio*-Mutanten heraus, daß das Muster der Morphogenese in der Gastrula vom BMP (bone morphogenic protein) gesteuert wird. Die BMPs gehören zur TGF-β-Familie sezernierter Signalmoleküle. Sie sind an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, wie Zelldifferenzierung, Zelladhäsion, Zellwanderung und programmiertem Zelltod (Apoptose). In der Embryonalentwicklung von Vertebraten und auch Wirbellosen kontrollieren BMPs fundamentale Prozesse in der frühen embryonalen Musterbildung und Organogenese.

Die morphogenetischen Bewegungen im ventralen Bereich des Zebrafischembryos, die zur Ausbildung von Epidermis und Blutkreislauf führen, hängen vom Vorkommen des BMP direkt ab. Jene Zellbewegungen, durch die das Embryonalschild mit dem Kopf und den zentralen Achsenorganen Neuralrohr und Somiten entstehen, werden durch die BMP-bindenden Antagonisten Chordin und Noggin geregelt, wobei das Noggin die Skelettogenese regelt.

Die Embryonen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* (DAUDIN) stellen ein ähnlich gutes Modell für toxikologische Untersuchungen dar, da ihre Entwicklung genau bekannt ist und der Einfluß von Noxen während der Einwirkzeit auf den Fortgang der Entwicklung gut abgeschätzt werden kann. Die Embryonen des Krallenfrosches sind experimentell gut zugänglich und zeichnen sich durch eine schnelle Frühentwicklung aus, was für entwicklungsbiologische und transplantationsbiologische Versuche, sowie für zellbiologische und transgenetische Untersuchungen genutzt wird. Im Vergleich mit *B.rerio* weist *Xenopus* leider recht lange Generationszeiten auf.

Nach der Befruchtung durchlaufen die dotterreichen *Xenopus*-Eier die für Amphibien typische totale inäquale Furchung. NIEUWKOOP & FABER (1975) teilten die Embryonal- und Larvalentwicklung des Krallenfrosches in morphologisch und histologisch

differenzierbare Stadien ein.

Die fischähnlichen Stadien von *Xenopus* sind morphologisch den frühen Zebrafischstadien äquivalent und auch in weiten Teilen der Musterbildung den gleichen zellulären Regulationsmechanismen unterworfen. Auch beim Krallenfrosch hängt der Ablauf der Morphogenese während der Gastrulation entscheidend vom BMP-Chordin-System ab. BMPs sind bei Xenopus für die Ausbildung ventraler, mesodermaler (Blut, Nieren) und ektodermaler (Haut) Strukturen notwendig und hemmen gleichzeitig die Bildung dorsaler, mesodermaler (Chorda, Muskelgewebe) und ektodermaler (ZNS) Strukturen (OELGESCHLÄGER 2004). Auch bei *Xenopus* wurden die Gene des sezernierten BMP-Antagonisten Chordin identifiziert, deren Translationsprodukt direkt an BMPs bindet und deren Interaktion mit BMP-Rezeptoren hemmt.

In der Arbeitsgruppe Insektenontogenese und Wirbeltierembryologie wurden an *X.laevis* in der Vergangenheit zahlreiche Substanzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, embryonale und larvale Fehlbildungen hervorzurufen. Dabei wurden auch Defekte der Extremitäten des Krallenfrosches untersucht, die u.a. durch Retinoide verursacht werden können (VETTER 1994).

Retinol erfüllt als essentielles Vitamin und in Form seiner Derivate eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben. Der Aldehyd Retinal bildet beispielsweise zusammen mit Opsin das für den Sehvorgang wichtige Rhodopsin. Retinsäure bzw. Retinat tritt während der Embryonalentwicklung als Nervenwachstumsfaktor in Erscheinung. Es wird von Zellen des Primitivknotens ausgeschüttet und ist beteiligt an der Ausbildung der embryonalen Längsachse. Nach heutigen Erkenntnissen wandern Nervenzellen entlang des Konzentrationsgradienten der Retinsäure.

Der Vitamin A Stoffwechsel wird im Wesentlichen durch sogenannte RBPs (Retinol-bindende Proteine) gesteuert. Retinol wird intrazellulär an RBP und als Retinol-RBP-Komplex (Holo-RBP) ins Blut abgegeben. Eine A-Hypovitaminose beeinflußt primär die Sekretion, nicht die Synthese von RBP in der Leber (GOODMAN & BLANER 1984). Eine Retinol-Gabe mobilisiert folglich die Abgabe als Holo-RBP (TIGL 2001).

Ein Fehlen von Retinol während der Embryogenese führt zum Tod, ein partielles Defizit in Form einer Hypovitaminose hat spezifische Fehlbildungsmuster zur Folge. Während der Embryonalentwicklung haben Retinoide einen starken Einfluß auf die Skelettogenese. Ihre exzessive Aufnahme hat verheerende Folgen für die Embryonalentwicklung (KALTER & WARKANY 1959). Die teratogene Wirkung von Vitamin A, aber auch seine essentiellen Funktionen werden zum größten Teil durch den

Metabolismus zu den aktiven Retinoiden vermittelt. Retinsäuren spielen als Oxidationsprodukte des Retinols auch hierbei eine zentrale Rolle, da sie an die nukleären Transkriptionsfaktoren RAR und RXR binden und die Expression bestimmter Gene beeinflussen können (ARNHOLD 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es herauszufinden, ob Detergentiengemische wie die handelsüblichen Flüssigwaschmittel ARIEL und PERWOLL in der Lage sind, definierte Defekte an Wirbeltierembryonen hervorzurufen, wie sie in Versuchen mit Retinoiden und anderen Substanzen bisher für Reinsubstanzen beschrieben wurden.

Da auf Seiten der Retinoide ein skelettogenes Potential während der Embryonalentwicklung nachgewiesen wurde, stehen Mißbildungen des Achsenskeletts im Mittelpunkt der Betrachtung. Als Versuchstiere dienen repräsentative Embryonal- und Larvalstadien von *B.rerio*, die mit den in der Frühentwicklung äquivalenten, fischähnlichen Embryonen und Larven von *X.laevis* gut verglichen werden können. Die permanent aquatische Lebensweise der Krallenfroschembryonen und -larven hat eine ebenfalls fischähnliche, kontinuierliche Exposition gegenüber Schadstoffen im umgebenden Medium zur Folge.

2 Material und Methoden

2.1 Haltung und Zucht der Versuchstiere

2.1.1 Die Versuchstiere

Mit dem Zebrabärbling *Brachydanio rerio* und dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* wurden für die embryotoxikologischen Versuche im Rahmen dieser Arbeit zwei aquatische Modellorganismen ausgewählt, die beide in der Ontogenese fischähnliche Stadien aufweisen.

2.1.1.1 *Brachydanio rerio* (HAM.-BUCH.)

Der 2,5 bis 3,5 cm große Zebrafisch *Brachydanio rerio* aus der Familie Cyprinidae stammt aus Hinterindien und gelangte erstmals 1905 als Zierfisch nach Europa (CREASER 1934; KNOPEK 1989).
Der Zebrabärbling ist ein kleiner tropischer Schwarmfisch, der heute eines der etabliertesten tierischen Modellsysteme für Studien über Entwicklungsprozesse und Genfunktionen während der Embryonalentwicklung darstellt. Die transparente Beschaffenheit der im Durchmesser etwa 0,7 mm großen Eier ist dabei von großem Vorteil, da sie eine makroskopische Betrachtung der Vorgänge innerhalb der Eihülle *in vivo* erlaubt.
Das 1,5 bis 2 µm dicke Chorion ist aus drei Schichten aufgebaut, wobei die beiden inneren Schichten von Poren (Durchmesser: 0,2 µm) durchsetzt sind. Die äußere Schicht ist homogen und etwa 0,1 µm dick (HART & DONOVAN 1983; BACHMANN 2002).

2.1.1.2 *Xenopus laevis* (DAUDIN)

Die Pipidae stellen die einzige Familie innerhalb der Unterordnung Aglossa dar, die insgesamt vier Gattungen und 16 Arten umfaßt. Die 3-20 cm großen, stark ans Wasser angepaßten Frösche sind durch das Fehlen einer Zunge gekennzeichnet.
Der zur Familie der Pipidae zählende südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* lebt ständig unter Wasser und hat ein gut ausgebildetes Seitenlinienorgan.

Für Forschungszwecke ist er u.a. deshalb interessant, weil er unter bestimmten Bedingungen (GASCHE 1943; OCHSE 1948) das ganze Jahr über zur Eiablage gebracht werden kann (VETTER 1994).
Ein *X.laevis*-Weibchen legt nach Stimulation mit humanem Gonadotropin mehrere tausend Eier, die etwa 1-1,5 mm groß sind..

2.1.2 Die Ausgangszuchten

2.1.2.1 Die Zucht von *Brachydanio rerio*

Der Zebrabärbling wird seit geraumer Zeit in der Abteilung Insektenontogenese und Wirbeltierembryologie des III. Zoologischen Instituts der Universität Göttingen gezüchtet, eignet er sich doch aufgrund seiner geringen Haltungsansprüche, einer hohen Nachkommenzahl und nicht zuletzt der enormen Transparenz seiner Eier ausgezeichnet für die entwicklungsbiologische Forschung.
Für die Ausgangszuchten wurden drei Monate alte Zebrabärblinge erworben, deren genetische Reinheit, gleiches Alter und Gesundheit durch den Züchter garantiert wurden. Die Fische wurden nach Geschlechtern getrennt in gefilterten und belüfteten 60-Liter-Aquarien gehalten. Bis zu 40 Tiere konnten auf diese Weise in einem Becken der beschriebenen Art untergebracht werden. Die Tiere wurden dreimal täglich mit einem Gemisch aus pflanzlichem Flockenfutter, roten Mückenlarven und getrockneten Daphnien gefüttert. Mit Hilfe einer Zeitschaltuhr wurde ein Tag-Nacht-Wechsel von 12:12 Stunden simuliert, wobei die Wassertemperatur konstant bei 24°C gehalten wurde. Bei einem wöchentlichen Wasserwechsel wurde dem frischen Wasser huminstoffhaltiger Wasseraufbereiter aus dem Aquarienfachhandel in der vom Hersteller empfohlenen Dosis beigemischt.

2.1.2.2 Die Zucht von *Xenopus laevis*

Die Krallenfrösche der Art *X.laevis* wurden als adulte Tiere erworben und zu je zwei gleichgeschlechtlichen Fröschen in abgedeckten 60-Liter-Aquarien gehalten. Diese wurden zur Hälfte mit Wasser gefüllt, um den lungenatmenden Tieren ein Luftreservoir zu gewähren.

Als Substrat diente grober Kies. Die Fütterung fand zweimal wöchentlich mit unbehandeltem und in kleine Würfel geschnittenem Rinderherz statt. Nahrungsreste und Kot der Tiere wurden jeweils am der Fütterung folgenden Tag mit Hilfe eines Schlauchs abgesaugt und das Wasser im gleichen Zug gewechselt.
Mit Hilfe einer Zeitschaltuhr wurde wie bei der Fischzucht ein Tag-Nacht-Wechsel von 12:12 Stunden simuliert.

2.1.3 Stimulation und Laichgewinnung

2.1.3.1 Laichgewinnung bei *Brachydanio rerio*

Die Geschlechtsreife setzt beim Zebrakärpfling etwa im vierten Lebensmonat ein. Für die Versuchsreihen wurden Fische im Alter zwischen vier und zwölf Monaten verwendet, da Weibchen fortgeschrittenen Alters aufgrund von Laichverhärtung und Eidegeneration meist deutlich geringere Nachkommenzahlen erreichen (KNOPEK 1989; FUSSMANN 1997). Insofern empfiehlt es sich, für die Zucht ausschließlich Tiere zu benutzen, die geschlechtsreif und damit voll ausgefärbt, jedoch noch nicht ausgewachsen sind (SCHEUERMANN 1989).
Für die Laichgewinnung wurden jeweils zwischen 20 und 28 Tiere im Geschlechterverhältnis 3:1 (Männchen:Weibchen) zusammengesetzt. Der natürliche Fortpflanzungstrieb der Tiere kann einen Tag vor der anvisierten Eiablage durch Gabe von schwarzen Mückenlarven (*Culex*) zusätzlich stimuliert werden, die anstelle des gewöhnlich angebotenen Futters in gleicher Menge *ad libitum* dargereicht werden.
Die Zebrafische beginnen direkt nach Einsetzen des Lichtes mit der Balz. Nach einem kurzen Körperkontakt werden gleichzeitig Eier und Spermien abgegeben, sodaß es zur Befruchtung kommt. Der gesamte Paarungs- und Laichvorgang ist bereits nach 30-45 Minuten abgeschlossen (SCHEUERMANN 1989; MONTE WESTERFIELD 1997; SCHULTE 1982).
Zebrabärblinge betreiben generell keine Brutpflege. Unter natürlichen Bedingungen laichen sie am Boden zwischen Pflanzen und Steinen ab. Die Eier rollen in Ritzen und Nischen des Untergrundes hinein und entziehen sich somit dem Zugriff von Laichräubern, zu denen auch Artgenossen und sogar die Elterntiere gehören können.
Um die Eier auch im artifiziellen Rahmen vor den räuberischen Eltern zu schützen wurden 22x14x6 cm große Laichauffangkästen verwendet, die mit Fliegengaze mit

einem Maschendurchmesser von 2,5 mm abgedeckt wurden. Die Behälter wurden beschwert und auf dem Aquarienboden plaziert. Außerdem wurden an ihrer Oberseite einige Kunststoffpflanzen befestigt um dem Kopulationsverhalten der Tiere entgegen zu kommen. Um die Laichaktivität der Fische auf den bereitgestellten Auffangbehälter zu fokussieren ist es sinnvoll, den verbleibenden Aquariengrund ohne Substrat und Bepflanzung zu belassen.

2.1.3.2 Laichgewinnung bei *Xenopus laevis*

Mit Hilfe der Injektion eines gonadotropen Hormons (HCG, Primogonyl ®) konnte die Paarungsbereitschaft der Frösche unabhängig von der Jahreszeit unterstützt werden.
Im Sinne einer Vorbehandlung wurde den zunächst noch getrennt gehaltenen Tieren 4-7 Tage vor der Kopulation Hormon in den dorsalen Lymphsack injiziert. Männchen wurden je 250 I.E., Weibchen je 100 I.E. Primogonyl verabreicht.
Nach 24 h wurden bei den Männchen die Innenseiten der Vorderbeine und bei den Weibchen die Analpapillen kontrolliert. Sofern die Innenseiten der Vorderbeine der Männchen tief schwarz geworden, und die Analpapillen der Weibchen deutlich geschwollen und gerötet waren, wurden den Männchen erneut 250 I.E. und den Weibchen 500 I.E. Primogonyl injiziert.
Als Ablaichbecken dienten Kunststoffwannen von 30 x 40 cm Größe, deren Boden durch ein Metallgitter mit einer Maschenweite von 1 x 1 cm ersetzt war. Diese Kunststoffwannen standen auf ca. 5 cm hohen Abstandhaltern (Kunststoffrohre) in einer weiteren Kunststoffwanne der Größe 40 x 60 cm. Auf diese Weise fiel der Laich direkt nach seiner Ablage durch das Gitter, wodurch er vor den Elterntieren geschützt und für die Versuchszwecke leicht entnommen werden konnte (VETTER 1994).

2.2 Versuchsrahmenbedingungen

2.2.1 Analyse des verwendeten Wassers

Als Lösungsmittel für die toxikologischen Versuche sowie als Aquarienwasser wurde Göttinger Leitungswasser verwendet. 80 Prozent der in Göttingen abgegebenen Trinkwassermenge stammen aus der Sösetalsperre im Harz, die restlichen 20 Prozent kommen aus den Wassergewinnungsanlagen Springmühle, Stegemühle und Weendespring.

Wasseranalyse der Stadtwerke Göttingen AG (Stand: März 2004):

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch vom 21. Mai 2001 (Trinkwasserverordnung-TrinkwV 2001)

Die Untersuchungsergebnisse der Abteilung für Allgemeine Hygiene und Umweltmedizin der Universität Göttingen sind den Grenzwerten gegenübergestellt. Das untersuchte Trinkwasser entspricht den Anforderungen der Trinkwasserverordnung. Innerhalb der gesetzlichen Vorgaben kann sich die Beschaffenheit des Trinkwassers ändern, z.B. durch jahreszeitlich oder niederschlagsbedingte sowie sonstige Schwankungen der Rohwasserqualität, oder durch Reaktionen in den Versorgungsleitungen.

Tab.1: Mikrobiologische Analyse I des Göttinger Trinkwassers

Mikrobiologische Parameter	Grenzwert	Untersuchungsbefund
Escherichia coli in 100 ml	0	0
Enterokokken in 100 ml	0	0
Coliforme Bakterien in 100 ml	0	0

Tab.2: Mikrobiologische Analyse II des Göttinger Trinkwassers

Mikrobiologische Parameter / Indikatorparameter	**Grenzwert / Anforderung**	**Untersuchungsbefund**
Clostridium perfringens in 100 ml (einschließlich Sporen)	0	0
Koloniezahl bei 22°C in 1 ml	ohne anormale Veränderung	0 - 10
Koloniezahl bei 36°C in 1 ml	ohne anormale Veränderung	0 - 10

Tab.3: Chemische Analyse I des Göttinger Trinkwassers

Chemische Parameter Teil I	**Grenzwert [mg/l]**	**Untersuchungsbefund [mg/l]**
Acrylamid	0,001	entfällt
Benzol	0,001	< 0,0002
Bor	1	0,01 - 0,03
Bromat	0,025 (0,01)	< 0,002
Chrom	0,05	< 0,001
Cyanid	0,05	< 0,01
1,2-Dichlorethan	0,003	< 0,0005
Fluorid	1,5	< 0,1
Nitrat	50	5 - 15
Pflanzenschutzmittel u.Biozidprodukte	0,0001	< 0,00005
Pflanzenschutzmittel u.Biozidprodukte ges.	0,0005	< 0,00005
Quecksilber	0,001	< 0,0001
Selen	0,01	< 0,001
Tetrachlorethen u.Trichlorethen	0,01	< 0,0001

Tab.4: Chemische Analyse II des Göttinger Trinkwassers

Chemische Parameter Teil II	Grenzwert [mg/l]	Untersuchungsbefund [mg/l]
Antimon	0,005	< 0,001
Arsen	0,01	< 0,001
Benzo-(a)-pyren	0,00001	< 0,00001
Blei	0,025 (0,01)	< 0,001
Cadmium	0,005	< 0,0001
Epichlorhydrin	0,0001	entfällt
Kupfer	2	< 0,01
Nickel	0,02	< 0,001
Nitrit	0,5	< 0,01
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	0,0001	< 0,00001
Trihalogenmethane	0,05	< 0,0001 - 0,001
Vinylchlorid	0,0005	entfällt

Tab.5: Chemische Indikatorparameter des Göttinger Trinkwassers

Indikatorparameter	Einheit	Grenzwert / Anforderung	Untersuchungs-befund [mg/l]
Chlorid	mg/l	0,2	0,02 - 0,1
Ammonium	mg/l	0,5	< 0,1
Aluminium	mg/l	250	8 - 16
Eisen	mg/l	0,2	0 - 0,1
Färbung (spektr.Absorptionskoeff. Hg 436 nm)	m^{-1}	0,5	0,1 - 0,4
Geruchsschwellenwert		2 bei 12°C 3 bei 25°C	ohne anormale Veränderung
Geschmack		ohne anormale Veränderung	ohne anormale Veränderung
Elektrische Leitfähigkeit	µS/cm	2500 bei 20°C	200 - 300
Mangan	mg/l	0,05	0 - 0,005

Natrium	mg/l	200	5 - 10
Organisch gebundener Kohlenstoff (TOC)	mg/l	ohne anormale Veränderung	< 0,5
Oxidierbarkeit	mg/l O_2	5	1 - 2
Sulfat	mg/l	240	20 - 50
Trübung	NTU	1	0,1 - 0,8
Wasserstoff-Ionen-Konzentration	pH-Einheiten	≥ 6,5 und ≤ 9,5	8,0 - 8,3
Tritium	Bq/l	100	entfällt
Gesamtrichtdosis	mSv/Jahr	0,1	entfällt

Tab.6: Physikalisch-chemische Analyse des Göttinger Trinkwassers

Bezeichnung	Einheit	Untersuchungsbefund [mg/l]
Wassertemperatur	°C	6 - 12
pH-Wert		8,0 - 8,3
pH-Wert der Calcitsättigung		8,0 - 8,3
Elektrische Leitfähigkeit	µS/cm	200 - 300
Säurekapazität bis pH = 4,3 ($K_{S4,3}$)	mol/m^3	1,4 - 1,9
Basekapazität bis pH = 8,2 ($K_{B8,2}$)	mol/m^3	0 - 0,05
Summe Erdalkalien	mol/m^3	1,0 - 1,3
Calcium	mg/l	30 - 40
Magnesium	mg/l	5 – 10
Natrium	mg/l	5 - 10
Kalium	mg/l	0,8 - 1,5
Chlorid	mg/l	8 - 16
Nitrat	mg/l	5 - 15
Sulfat	mg/l	20 - 50
Phosphorverbindungen	mg/l	< 0,1
Siliciumverbindungen	mg/l	12 - 14
Organisch gebundener Kohlenstoff	mg/l	< 0,5
Aluminium	mg/l	0,02 - 0,1
Sauerstoff	mg/l	10 - 12

In § 11 Abs. 1 Satz 1 der Trinkwasserverordnung sind die zur Trinkwasseraufbereitung zugelassenen Zusatzstoffe genannt.Von diesen werden folgende dem Trinkwasser zugesetzt:

Tab.7: Zusatzstoffe zur Aufbereitung des Göttinger Trinkwassers

Zusatzstoff	Zweck	Bemerkung
Natriumhypochlorit	Desinfektion	
Chlordioxid	Desinfektion	
Natriumsilikate	Einstellung des pH-Wertes und Korrosionshemmung	
Natriumcarbonat	Einstellung des pH-Wertes und Korrosionshemmung	
Kalkhydrat	Einstellung des pH-Wertes	
Aluminiumsulfat	Flockung	
Anionisches Polyacrylamid	Flockungshilfsmittel	zeitweise
Pulveraktivkohle	Adsorption	zeitweise

Flockungsmittel und Flockungshilfsmittel sowie die Pulveraktivkohle werden bei der Trinkwasseraufbereitung bis auf technisch unvermeidbare und technologisch unwirksame Anteile aus dem Wasser wieder entfernt. (Gesetz über die Umweltverträglichkeit von Wasch- und Reinigungsmitteln vom 5. März 1987 (Wasch- und Reinigungsmittelgesetz (WRMG))

Tab.8: Härte des Göttinger Trinkwassers

Bezeichnung	Einheit	Untersuchungsbefund
Gesamthärte	°dH	5,6 - 7,3
Härtebereich		1

Entsprechend dieser Einstufung sind die Dosierempfehlung der Waschmittelhersteller zu handhaben. Allgemeine Information:

Tab.9: Wasserhärtebereiche

Härtebereich	Gesamthärte [mmol/l]	deutsche Härtegrade [°dH]
1	bis 1,3	0 bis 7,3 (weich)
2	1,3 - 2,5	7,3 - 14,0 (mittel)
3	2,5 - 3,8	14,0 - 21,2 (hart)
4	über 3,8	über 21,2 (sehr hart)

Internet-Quelle zum Kapitel 2.2.1: *(http://www.stadtwerke-goettingen.de/wasser/wasseranalyse.php)*

2.3 Testsubstanzen

2.3.1 Waschmittel und Waschmittelinhaltsstoffe

Im deutschen Sprachgebrauch werden unter dem Begriff "Detergentien" (auch: Detergentia; lat.: *detergere* - abwischen) allgemein synthetische oder organische (z.B. Gallensäuren), grenzflächenaktive Substanzen verstanden, die anionisch, kationisch, nichtionisch oder ampholytisch aufgebaut sein können. In der deutschen Gesetzgebung trat der Begriff zeitweilig nicht mehr auf. Die Verbindungen wurden zusammen mit Seifen als Tenside bezeichnet.
Inzwischen ist die Bezeichnung über die europäische Detergentienverordnung wieder üblich.
Im Sinne dieser Verordnung bezeichnet der Begriff "Detergens" einen Stoff oder eine Zubereitung, der/die Seifen oder andere Tenside enthält und für Waschprozesse auf Wasserbasis bestimmt ist.
Der Begriff „Detergens“ ist in Artikel 2 Nr.1 der EG-Verordnung definiert (Verordnung (EG) Nr. 648/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 31. März 2004).
(*http://www.bmu.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/wrmg_entwurf.pdf*)

2.3.1.1 Tenside

Tenside besitzen heute mannigfaltige Verwendung als Reinigungsstoffe in Industrie und Haushalt und zudem als Hilfsstoffe in der Pharmazie.
In fast allen Reinigungsmitteln und in allen Waschmitteln sind Tenside die wichtigsten Wirkungsbestandteile. Tenside machen lipophile Schmutzpartikel für Wasser benetzbar. Sie sind Lösungsvermittler zwischen unterschiedlichen Phasen, weshalb sie auch als grenzflächenaktive Substanzen bezeichnet werden.
Als Grenzfläche wird die Trennfläche zwischen zwei aneinander grenzenden festen, flüssigen oder gasförmigen Phasen bezeichnet (LAUX 1960).
Ihre Bezeichnung bezieht sich jeweils auf die Aggregatzustände der Phasen, zwischen denen sie vermittelnd wirken. So spricht man von Emulgatoren, wenn es sich um die Grenzflächen zwischen zwei flüssigen Phasen handelt. Als Schaumbildner vermindern sie die Grenzflächenspannung zwischen gasförmigen und flüssigen Stoffen, und als Solubilisatoren oder Netzmittel zwischen Flüssigkeiten und Feststoffen (JELINEK 2001).

2.3.1.2 Chemischer Aufbau von Tensiden

Das grenzflächenaktive Verhalten von Tensiden läßt sich auf den chemischen Bau dieser Stoffgruppe zurückführen.
Tenside sind amphiphatische Moleküle. Sie besitzen einen hydrophilen „Kopf“ und einen lipophilen „Schwanz“. Da die hydrophilen Eigenschaften überwiegen, liegen die Moleküle bei niedriger Konzentration in wässrigem Medium als Monomere gelöst vor (WINKLER 1990).
Die energetisch ungünstige Wechselwirkung des Wassers mit den hydrophoben Teilen führt dazu, daß die Einzelmoleküle oberhalb einer bestimmten kritischen Konzentration (critical micellar concentration, CMC) zu kugelförmigen, ellipsoiden oder im Falle der Gallensäuren zu komplexeren Micellen aggregieren. Im Konzentrationsbereich oberhalb der CMC bleibt somit die Monomer-Konzentration konstant (TANFORD 1973).
Ein Teil der Detergensmoleküle entgeht der thermodynamisch ungünstigen Wechselwirkung der lipophilen Regionen mit dem Wasser durch die Orientierung in einem monomolekularen Film an der Wasser-Luft-Grenzfläche (HELENIUS 1975).
Detergentien werden auch durch ihre HLB (hydrophobic lipophilic balance) charakterisiert. Die HLB ist definiert als das Verhältnis des hydrophilen zum lipophilen Anteil des Moleküls. Die Werte schwanken zwischen 1 und 40, wobei 1 stark lipophil (Diglyceride) und 40 stark hydrophil (Natriumdodecylsulfat, SDS) bedeutet (OSTRO 1983; GREGORIADIS 1984; ARNDT 1986).
Die zahlreichen verschiedenen Tenside unterscheiden sich in ihrem molekularen Aufbau nur geringfügig im hydrophoben, aber deutlich im hydrophilen Molekülteil. Beim hydrophoben Molekülteil handelt es sich stets um einen Kohlenwasserstoffrest. Bei dem hydrophilen Molekülteil werden anionische, kationische, nichtionische und ampholytische Reste unterschieden.

2.3.1.3 Anionische Tenside

Den größten Anteil der in Wasch- und Reinigungsmitteln enthaltenen Tenside stellen die anionischen Tenside. Die wichtigsten Vertreter sind heute LAS (lineares Alkylbenzolsulfonat), SAS (sekundäres Alkylsulfonat), FAS (Fettalkoholsulfat) und Seife.

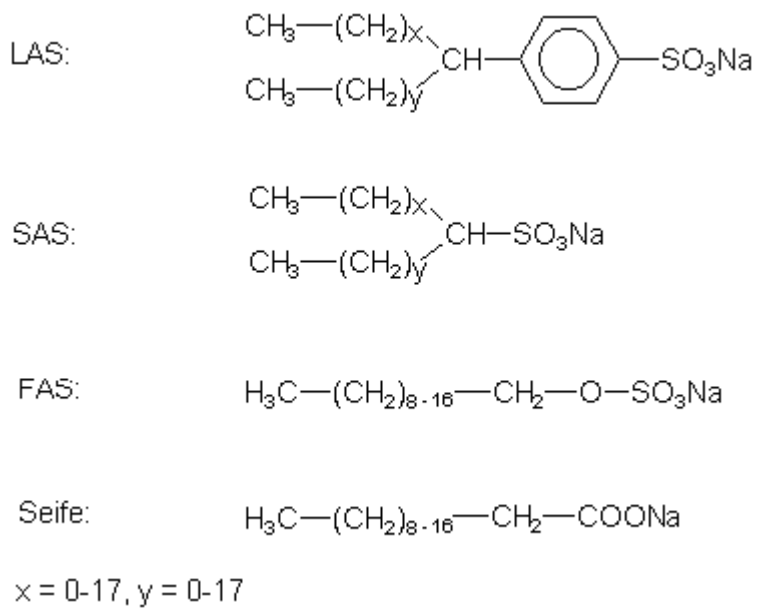


Abb.1: Strukturformeln anionischer Tenside
Internet-Quelle: (*http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/wsu-haush/*)

Zur Gruppe der Fettalkoholsulfate (FAS) wird auch das in Bezug auf seine starke Hydrophilie bereits genannte Natrium-Laurylsulfat (NLS, SDS, Natriumdodecylsulfat, Schwefelsäurelaurylester Natriumsalz) gezählt.

2.3.1.4 Kationische Tenside

Kationische Tenside sind in Weichspülern enthalten. Als waschaktive Substanzen sind kationische Tenside ungebräuchlich. Sie können aber die Wirkung anionischer Tenside aufgrund der entgegengesetzten Ladung beeinträchtigen.

2.3.1.5 Nichtionische Tenside

Bei den nichtionischen Tensiden trägt der hydrophile Molekülteil keine Ladung. Dieser Molekülteil enthält meist alkoholische Hydroxygruppen oder Polyether. Die stark elektronegativen Sauerstoffatome tragen zur negativen Polarisierung des hydrophilen Molekülteils bei. Dadurch sind die Eigenschaften der nichtionischen Tenside denen der anionischen Tenside ähnlich.
Beispiele für nichtionische Tenside sind AEO (Fettalkoholpolyglycolether), Saccharosefettsäureester oder APG's (Alkylpolyglycoside).

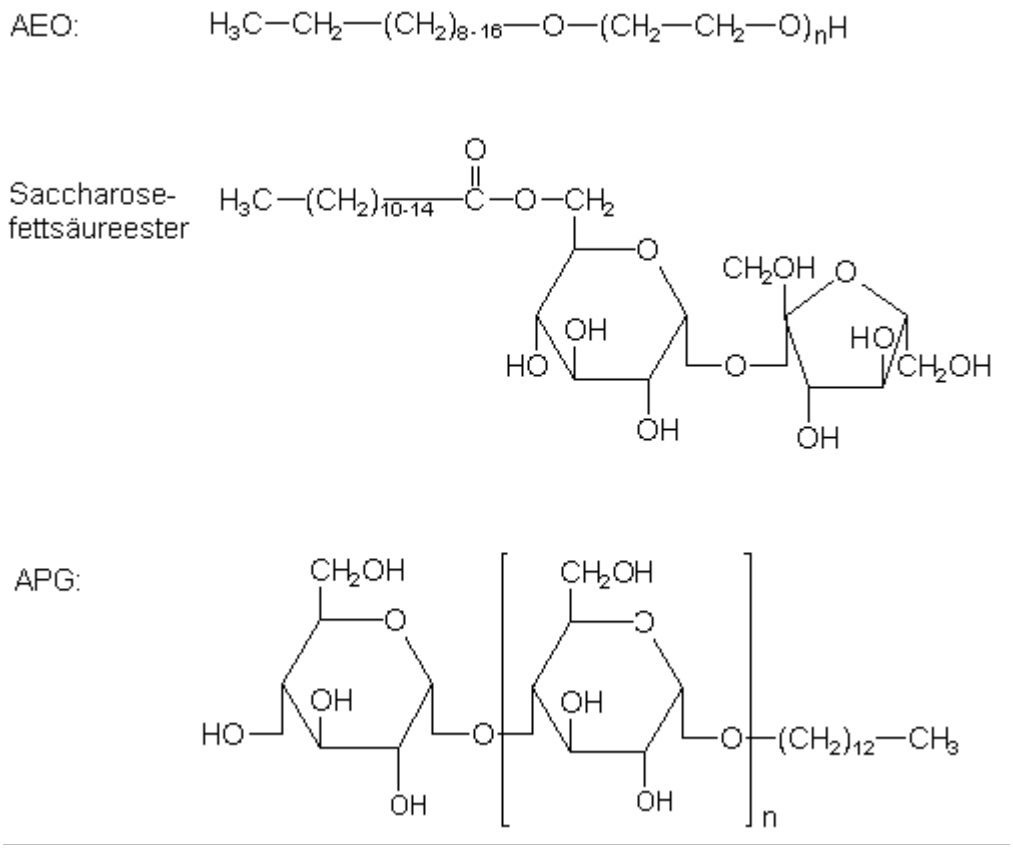


Abb.2: Strukturformeln nichtionischer Tenside
Internet-Quelle: (*http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/wsu-haush/*)

AEO ist in Reinigern und flüssigen Waschmitteln ein viel verwendetes nichtionisches Tensid. Die Tenside auf Zuckerbasis, APG's und Saccharosefettsäureester, werden erst seit einigen Jahren verwendet. Das APG hat dabei den Vorteil, daß es auch in alkalischer Waschlauge stabil ist, während der Saccharosefettsäureester in alkalischen Waschlaugen schnell hydrolysiert wird.

2.3.1.6 Wirkungsweise von Tensiden

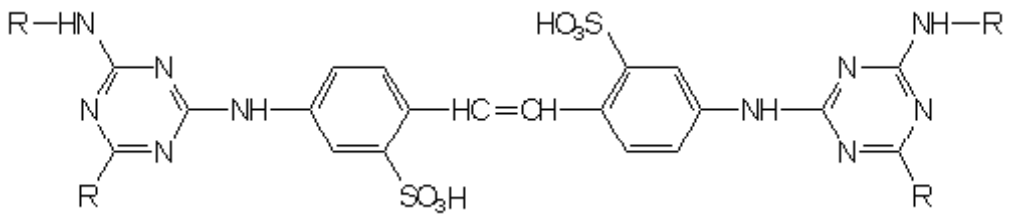
Die chemische Wirkungsweise von anionischen, nichtionischen und kationischen Tensiden ist insgesamt ähnlich. Sie soll am Beispiel der anionischen Tenside erläutert werden.

Durch den Lösungsvorgang entstehen aus den Natriumsalzen der Tenside die negativ geladenen Anionen der Tenside. Die hydrophoben Molekülreste lagern sich an Partikel an und stellen so eine Art Verbindung zum umgebenden Wasser her.

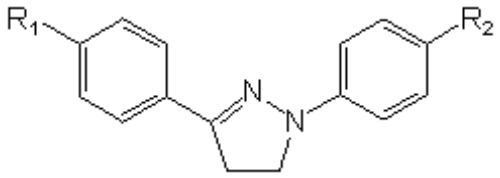
Die Tensidmoleküle sind negativ geladen, so daß es zwischen der mit Tensidmolekülen belegten Oberfläche und dem mit Tensidmolekülen belegten Partikeln zu einer elektrostatischen Abstoßung kommt.

2.3.1.7 Optische Aufheller und Bleichmittel

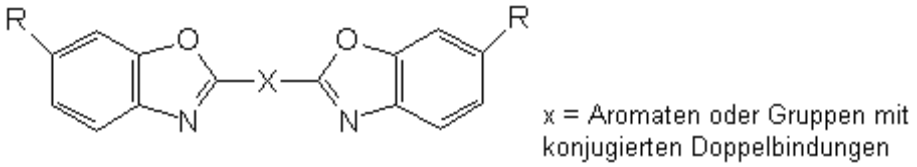
Optische Aufheller bzw. Bleichmittel wirken oxidierend. Bleichmittel enthalten "aktiven Sauerstoff" in chemisch gebundener Form. Mit Ausnahme von Natriumhypochlorit sind alle verwendeten Bleichmittel sogenannte Peroxo-Verbindungen.



4,4'-Bis-(triazinylamino)-stilben-2-2'-disulfonsäure (DASC)



1,3-Diphenylpyrazolin (PYZ)



Bis-(benzoxazol-2-yl) (BO)

Abb.3: Strukturformeln optischer Aufheller

Internet-Quelle: (*http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/wsu-haush/*)

Tab.10: Bleichmittel

Substanz	**Formel**
Natriumhypochlorit	(NaOCl)
Wasserstoffperoxid	(H_2O_2)
Perborat	($NaBO_2 \cdot H_2O_2$)
Percarbonat	($2\ Na_2CO_3 \cdot 3\ H_2O_2$)
Peroxoessigsäure	(Strukturformel s.u.)
Diperoxoazelainsäure	(Strukturformel s.u.)
Diperoxododecandisäure	(Strukturformel s.u.)

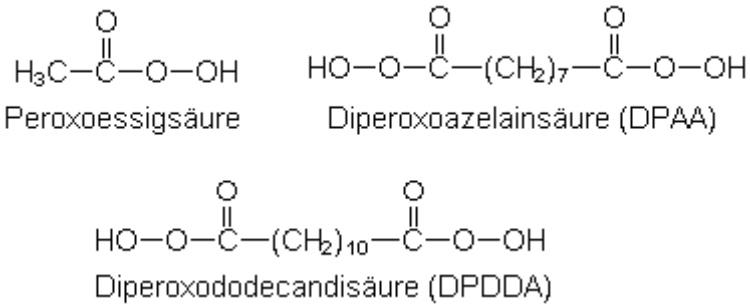


Abb.4: Strukturformeln von Bleichmitteln

Internet-Quelle: (*http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/wsu-haush/*)

2.3.1.8 Bleichmittelaktivatoren

Damit das in Waschmitteln viel verwendete Bleichmittel Perborat auch bei niedrigen Temperaturen wirken kann, müssen Aktivatoren (Tetraacetylethylendiamin, TAED oder Tetraacetylglykoluril, TAGU) zugesetzt werden. Diese bilden im alkalischen Medium durch Reaktion mit Perborat auch bei Temperaturen unter 60 °C eine bleichaktive Verbindung, die Peroxoessigsäure.

Die so gebildete Peroxoessigsäure zerfällt bereits bei Raumtemperatur unter Abgabe von "aktivem Sauerstoff". Peroxosäuren geben bereits ab 30 °C "aktiven Sauerstoff" ab.

2.3.1.9 Enthärter und Komplexbildner

Enthärter haben die Eigenschaft, die härtebildenden Ionen (Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Ionen) aus dem Wasser zu entfernen. Die größte Bedeutung hat mengenmäßig die Entfernung von Calcium-Ionen.
Komplexbildner entfernen ebenfalls Ionen aus Wasser oder Schmutz. Je nach Art des Komplexbildners werden aber nicht nur härtebildende Ionen, sondern auch andere Metall-Ionen chemisch gebunden.
Die meisten Tenside werden in ihrer oberflächenaktiven Eigenschaft durch die härtebildenden Ionen beeinträchtigt. Seife wird durch Calcium-Ionen in Form der schwer löslichen Kalkseife ausgefällt. Kalkseife hat keine Tensideigenschaften mehr.
Die dispergierende Wirkung von bestimmten Enthärtern (z.B. Natriumtriphosphat) beruht weniger auf dem Entzug der Metall-Ionen als auf der Adsorption negativ geladener Triphosphat-Ionen an Partikel, die dadurch negativ aufgeladen werden. Die gleich geladenen Partikel zerfallen und stoßen sich außerdem gegenseitig ab. Auch werden sie von negativ geladenen oder polarisierten Oberflächen abgestoßen.
Zitronensäure wirkt ebenfalls wasserenthärtend, indem es Calcium-Ionen als Calciumcitrat ausfällt.

2.3.1.10 Enzyme

Zu den Enzymen gehören Proteasen, Amylasen, Lipasen, Cellulasen, die spezifisch für ein bestimmtes organisches Substrat sind und dieses in immer gleicher Art und Weise abbauen.
Enzyme sind grundsätzlich nur in einem begrenzten Temperaturbereich wirksam, der meist zwischen 20 °C und 65 °C liegt. Eine Protease, deren Wirkungsoptimum bei etwa 60 °C liegt, hat bei 30 °C nur noch 5 bis 10 % ihrer optimalen Wirkung. Umgekehrt kann das Enzym bei 95 °C schon nach einigen Minuten völlig unwirksam sein.
Da Enzyme trotz zum Teil hoher Temperatur- und Alkalistabilität leicht denaturierbare Proteine sind, sind sie empfindlich gegen verschiedene Waschmittelbestandteile, beispielsweise gegenüber oxidierenden Bleichmitteln, aber auch gegenüber Tensiden und Enthärtern.

2.3.1.11 Lösungsmittel

Lösungsmittel sind in allen flüssigen Wasch- oder Reinigungsmitteln enthalten. Das wichtigste und gleichzeitig umweltfreundlichste Lösungsmittel ist Wasser.

Viele Stoffe, z.B. Lipide, sind in Wasser unlöslich, aber in organischen Lösemitteln gut löslich.

Tab.11: Lösungsmittel in Haushaltsreinigern

Lösungsmittel	**Toxizität**	**Umweltverträglichkeit**
Ethanol	gering	gut abbaubar
Isopropanol	gering	gut abbaubar
Aceton	gering	gut abbaubar
Terpene	mittel	abbaubar
Benzin	mittel	abbaubar
Toluol	mittel	schlecht abbaubar
Chloroform	hoch	sehr schlecht abbaubar
Perchlorethylen	hoch	sehr schlecht abbaubar
Trichlorethan	hoch	sehr schlecht abbaubar

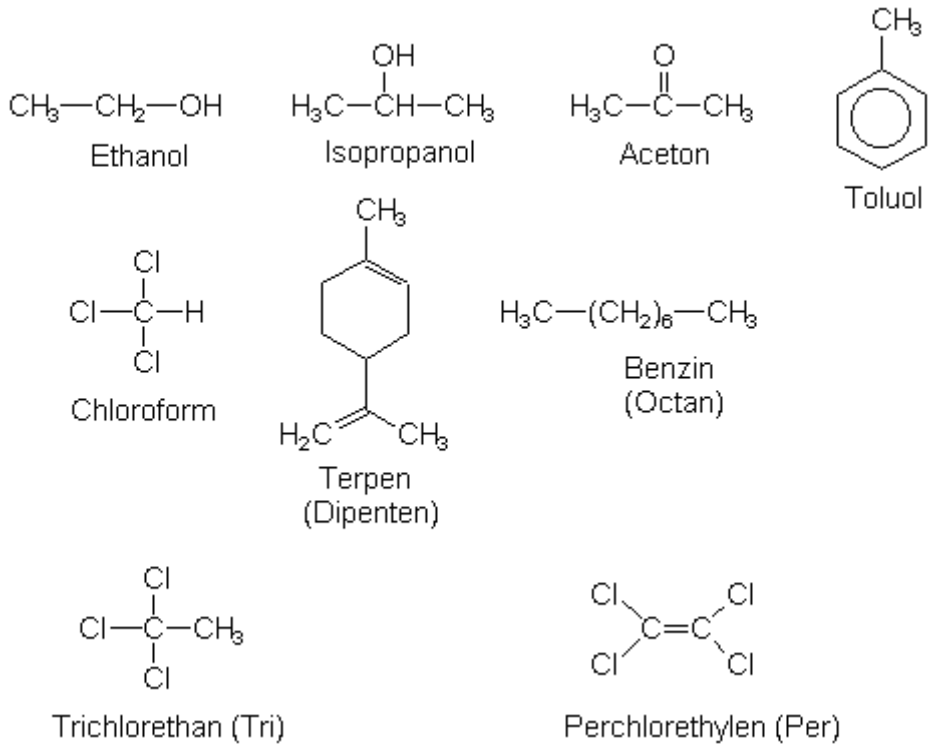


Abb.5: Strukturformeln von Lösungsmitteln

Internet-Quelle: (*http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/wsu-haush/*)

2.3.1.12 Säuren

Säuren sind in Reinigern enthalten, um schwer wasserlösliche Stoffe durch chemische Auflösung in wasserlösliche Bestandteile umzuwandeln. Essigsäure und Zitronensäure sind die am meisten verwendeten organischen Säuren.

Tab.12: Säuren in Haushaltsreinigern

Formel	**Name**	**Säurestärke**
H_2SO_4 [a)]	Schwefelsäure	stark
HCl [a)]	Salzsäure	stark
H_3PO_4 [a)]	Phosphorsäure	mittel
$H_2N\text{-}SO_3H$ [a)]	Amidosulfonsäure	mittel
KH_2PO_4 [b)]	Kaliumdihydrogenphosphat	mittel
$NaHSO_4$ [b)]	Natriumhydrogensulfat	mittel
$HCOOH$ [c)]	Ameisensäure	mittel
$H_3C\text{-}COOH$ [c)]	Essigsäure	schwach
$H_3C\text{-}CH(OH)\text{-}COOH$ [c)]	Milchsäure	schwach
$C_6H_8O_7$	Zitronensäure	schwach

[a)] anorganische Säuren
[b)] saure Salze anorganischer Säuren
[c)] organische Säuren

2.3.1.13 Sonstige Inhaltsstoffe

Neben den genannten Substanzen werden Waschmitteln eine Reihe weiterer Stoffe zugesetzt. Dazu gehören Alkalien, Antimikrobia, Desinfektionsmittel, Konservierungsmittel, Farbstoffe, Hydrotropika, Korrosionsinhibitoren, Metalle, Parfümöle, Schaumregulatoren, Stabilisatoren, Stellmittel, Vergrauungsinhibitoren, Builder (Gerüststoffe) und Weichspüler.

Internet-Quelle zum Kapitel 2.3.1: (*http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/wsu-haush/*)

2.3.2 Testdetergentien

2.3.2.1 ARIEL

Tab.13: Gefährliche Inhaltsstoffe des Vollwaschmittels ARIEL

Bestandteil	**Gehalt [%]**	**Symbol**	**R-Sätze**
Amine, C10-16-Alkyldimethyl-, N-Oxide	1-<5	Xi & N	38-41-50
Benzolsulfonsäure, Mono-C10-18-alkylderivate, Na-Salze	10-<20	Xn	22-38-41
Ethanol	1-<5	F	11
Polymer Fettalkoholethoxylat, C14-15	5-<10	Xn & N	22-41-50

(http://www.pgprof.de/datenblaetter/fgh/Professional)

Tab.14: Inhaltsstoffe des Vollwaschmittels ARIEL *

Inhaltsstoff	**Anteil [%]**
Phosphonate	< 5%
Kationische Tenside	
Nichtionische Tenside	5-15%
Seife	
Anionische Tenside	15-30%
Enzyme: Amylase Cellulase Lipase Protease	
Optische Aufheller	+
Zitronensäure	+
Lösungsmittel	+
Schmutzträger	+
Faserschutzmittel	+
Parfüm	+
Konservierungsstoffe	-

* (Angaben laut Verpackung)

2.3.2.2 PERWOLL

Tab.15: Inhaltsstoffe des Feinwaschmittels PERWOLL *

Inhaltsstoff	**Anteil [%]**
Phosphonate	-
Kationische Tenside	< 5%
Nichtionische Tenside	15-30%
Seife	-
Anionische Tenside	< 5%
Enzyme: Amylase Cellulase Lipase Protease	-
Optische Aufheller	-
Zitronensäure	-
Lösungsmittel	-
Schmutzträger	-
Faserschutzmittel	-
Parfüm	+
Konservierungsstoffe	+

* (Angaben laut Verpackung)

2.3.3 Retinol

Als Vergleichssubstanz zu den Versuchen mit Detergentien wurde Retinol (all–trans-3, 7–Dimethyl–9-(2, 6, 6–trimethyl–1–cyclohexan-1-yl)-2, 4, 6, 8–nonatetran–1-ol), ein Vertreter der Vitamin A-Gruppe als Retinol-Palmitat (Merck) eingesetzt.
Retinol (Vitamin A, Axerophthol) ist ein essentielles Vitamin mit der Summenformel $C_{20}H_{30}O$. Beim Retinol-Palmitat handelt es sich um eine wasserlösliche Form des sonst fettlöslichen Retinols (VETTER 1994). An die Hydroxylgruppe des Terpens Retinol ist beim Retinol-Palmitat ein Fettsäurerest (Palmitinsäure) gebunden.

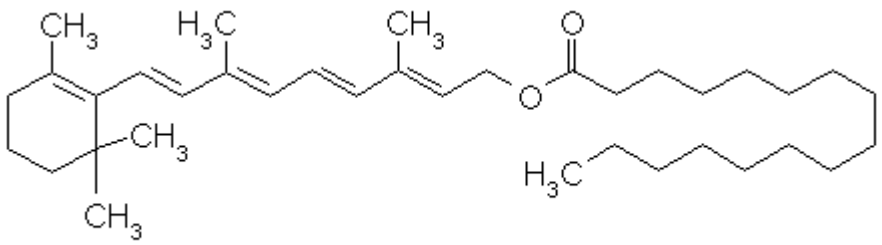


Abb.6: Strukturformel von Retinol-Palmitat

2.4 Toxikologische Tests

2.4.1 Konzentrationen

2.4.1.1 ARIEL

Alle Konzentrationsangaben von Detergentien der vorliegenden Arbeit sind in ml/l angegeben. Es muß darauf hingewiesen werden, daß es sich dabei jeweils um die kürzere Schreibweise der exakteren Angabe in ml Detergens / l Lösung handelt.
Für die durchgeführten Testserien an *B.rerio*-Embryonen wurden neben Kontrollen ohne Detergens verschiedene Konzentrationen des Flüssigwaschmittels eingesetzt, die, was in Vorversuchen herausgefunden werden konnte, einen auf die Versuchstiere bezogenen Effektbereich zwischen der vollständigen Wirkungslosigkeit bis hin zum Tod aller Fischembryonen innerhalb von 24 Stunden abdeckten.
Aufgrund der Vermutung, daß mit dem Voranschreiten der Embryonalentwicklung auch eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber chemischen Noxen einhergeht, wurden

für die untersuchten Stadien unterschiedliche Konzentrationen des verwendeten Detergens gewählt.
Für das Entwicklungsstadium 10 wurden neben Kontrollen ohne Detergens Lösungen mit Konzentrationen von 0,004 ml/l, 0,008 ml/l, 0,016 ml/l und 0,032 ml/l verwendet.
In den Versuchen mit Fischen des Entwicklungsstadiums 12 wurden mit Konzentrationen von 0 ml/l, 0,004 ml/l, 0,012 ml/l, 0,02 ml/l und 0,04 ml/l nur geringfügig höhere Waschmittelkonzentrationen eingesetzt.
Wiederum höher wurden die Konzentrationen der Testlösungen für die Fische des Entwicklungsstadiums 16 gewählt. Mit 0 ml/l, 0,012 ml/l, 0,036 ml/l, 0,06 ml/l und 0,12 ml/l kamen hier die am höchsten konzentrierten Detergenslösungen zum Einsatz.

2.4.1.2 PERWOLL

Die Versuche mit dem Feinwaschmittel PERWOLL wurden mit Zebrafischembryonen des Entwicklungsstadiums 12 durchgeführt. Neben Kontrollen ohne Detergens wurden Lösungen mit Konzentrationen von 0,008 ml/l, 0,029 ml/l, 0,044 ml/l und 0,08 ml/l verwendet.

2.4.1.3 Retinol

In den toxikologischen Versuchen mit Retinol wurden die Entwicklungsstadien 14, 16, 18, 23, 42 und 53 von *Xenopus laevis* Konzentrationen von 0,1 g/l, 0,2 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l, und 5 g/l Retinol-Palmitat ausgesetzt.

2.4.2 Die untersuchten Entwicklungsstadien

2.4.2.1 *Brachydanio rerio*

Um Aussagen über die Wirkung der zu untersuchenden Substanzen machen zu können, wurden für die embryologischen Testserien die Stadien 10, 12 und 16 der Embryonalentwicklung von *B.rerio* ausgewählt, die durch spezifische Vorgänge im Inneren des heranreifenden Eies gekennzeichnet sind.

2.4.2.1.1 Entwicklungsstadium 10

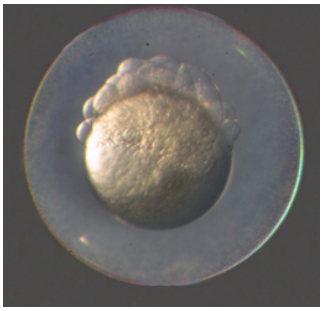


Abb.7: Frühe Blastula von *Brachydanio rerio*

Das in Abb.7 dargestellte Stadium 10 der Zebrafischentwicklung repräsentiert die Phase der frühen Blastula, die etwa 2 ½ Stunden nach der Befruchtung zu beobachten ist. Charakteristisch für dieses Embryonalstadium sind die am animalen Pol hoch über dem Dotter aufgetürmten Blastomeren.

2.4.2.1.2 Entwicklungsstadium 12

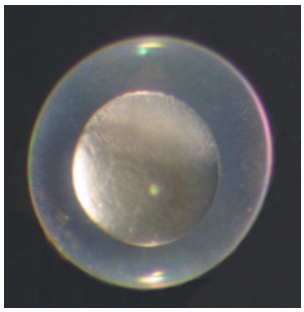


Abb.8: Späte Blastula von *Brachydanio rerio*

Nachdem es zu einer Abflachung der zweischichtigen Keimscheibe gekommen ist, befindet sich der Embryo im Entwicklungsstadium 12, der späten Blastula, das in Abb.8 dargestellt ist. Zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung senken sich viele kleine Blastomeren in den Dottersack ein, wodurch der Embryo allmählich eine Kugelform annimmt.

2.4.2.3 Entwicklungsstadium 16

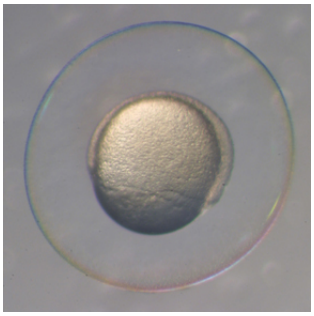


Abb.9: Gastrula von *Brachydanio rerio*

Das ebenfalls in den Testserien untersuchte Entwicklungsstadium 16 ist auf Abb.9 zu sehen. Es stellt den Abschluß der Epibolie des Dotters durch den Zebrafischembryo dar und ist ca.7 ¾ Stunden nach der Befruchtung erreicht.

2.4.2.2 *Xenopus laevis*

Die Versuche mit Retinol–Palmitat wurden an *Xenopus*-Embryonen und -Larven der Entwicklungsstadien 14, 16, 18, 23, 42 und 53 durchgeführt. Die dabei auftretenden äußerlich sichtbaren Mißbildungen wurden qualitativ und quantitativ erfaßt.
Die Stadien 14, 16 und 18 repräsentieren frühe Embryonalstadien, um die Wirkung des Retinol-Palmitats auf die Musterbildung und die Determination des embryonalen Gewebes zu untersuchen. Die Entwicklungsstadien 14 bis 18 sind die Stadien der Neurulation.
Das Stadium 23 stellt den Beginn des Schwanzknospenstadiums dar und wurde gewählt, um den Einfluß des Retinols auf Entwicklungsprozesse nach der Neurulation zu untersuchen.
Die Larvenstadien 42 und 53 wurden gewählt, ob in diesem Abschnitt der Entwicklung noch Umdeterminierungen durch Retinol möglich sind und, ob auch hier noch Entwicklungsstörungen auftreten.

2.4.3 Exposition

2.4.3.1 Exposition von *B.rerio*-Embryonen und –Larven

Die Detergentien-Wirkung auf *Brachydanio*-Embryonen wurde anhand unterschiedlicher toxikologischer Parameter getestet.
Neben der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Entwicklungsstadium wurde die Abhängigkeit des Sterbens/Überlebens der Embryonen, ihr Schlüpferfolg, sowie die Häufigkeit und Art beobachteter Mißbildungen hinsichtlich des Faktors Expositionsdauer untersucht. Darunter versteht man die definierte Zeitspanne vom Beginn des Versuchs bis zum Austausch der jeweiligen Testlösung durch Wasser.
Untersucht wurden die Expositionsdauer 1 Stunde an Embryonen des Entwicklungsstadiums 12, die Expositionsdauer 24 Stunden an Fischen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16.
Bereits vor Versuchsbeginn wurden die einzelnen und unterschiedlich konzentrierten Lösungen der Detergentien hergestellt und auf die Temperatur des Ablaichbeckens erwärmt. Nachdem unter dem Binokular die frühe Entwicklung der Fischembryonen mitverfolgt werden konnte, wurden die Eier bei Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums mit Hilfe flexibler Polyäthylen-Pipetten einzeln in 24-Well-Platten plaziert. Diese waren zuvor mit Wasser oder den unterschiedlich konzentrierten und auf die Temperatur des Ablaichbeckens erwärmten Lösungen gefüllt worden. Bis zum Ersetzen der Versuchslösungen durch Wasser oder bis zur weiteren Untersuchung konnte durch Schwimmen der 24-Well-Platten auf der Wasseroberfläche der Ablaichbecken für eine konstante Temperatur gesorgt werden.

2.4.3.2 Exposition von *X.laevis*-Embryonen und -Larven

Der Versuche mit Retinol-Palmitat wurden bezüglich des Ablaufes äquivalent zu den Zebrafischversuchen durchgeführt. Allerdings wurden die sechs Entwicklungsstadien von *X.laevis*-Embryonen und –Larven über einen Zeitraum von 24, 48 und 96 Stunden den unterschiedlichen Konzentrationen von Retinol-Palmitat ausgesetzt. Parallel wurden ebenfalls Kontrollen durchgeführt.

2.4.4 Toxikologische Auswertung

Die Mortalität , auch Sterblichkeitsrate genannt, (von lat. *mortalitas* - das Sterben, die Sterblichkeit) ist ein Begriff aus der Demographie. Man versteht unter der sogenannten rohen Sterberate den Anteil der Individuen einer definierten Population, die in einem bestimmten Zeitraum (meist 1 Jahr) bezogen auf 1.000 Individuen der Population sterben.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Auswertungen wurde von der demographischen Definition der Mortalität dahingehend abgewichen, daß zwar ein Zeitraum – in diesem Fall 24 Stunden – als Größe vorgegeben war, der Begriff Population hier jedoch auf die Gesamtzahl der Versuchstiere einer Gruppe, die durch Zugehörigkeit zu einer Konzentration des Detergens, einer Expositionsdauer und einem Entwicklungsstadium gekennzeichnet waren, bezogen werden muß.

Neben den untersuchten Faktoren wie der Empfindlichkeit bzw. Resistenz der Versuchstiere, der Expositionszeit und der Konzentration der applizierten Noxe, sind beispielsweise die Laichgüte und die Wasserqualität Einflussgrößen für die Mortalität, auf deren Konstanz während der Versuche geachtet wurde, und die hier daher nicht näher behandelt werden.

Von der Mortalität ist die Letalität zu unterscheiden, bei der die Zahl der Verstorbenen nicht auf die Gesamtpopulation, sondern auf die Gesamtzahl der Exponierten bezogen ist (zudem meist ohne Berücksichtigung eines Zeitrahmens).

Auf dieser Grundlage konnte die Letalität in Form der Letalen Dosis, also des LD_{50}-Wertes bestimmt werden, der beschreibt, bei welcher Konzentration der Noxe 50% der exponierten Embryonen nach 24 Stunden gestorben sind.

Die Anzahl der lebenden bzw. toten Embryonen wurde in allen Versuchen und unabhängig von allen übrigen Parametern grundsätzlich nach 24 Stunden bestimmt, der Schlüpferfolg der Fische durch Zählung der Tiere, die die Eihülle 5 Tage nach der Befruchtung vollständig verlassen hatten.

2.5 Untersuchung und Präparation von Embryonen und Jungtieren

2.5.1 Untersuchung lebender Embryonen und Jungtiere

Um Erkenntnisse über den Einfluß von Detergentien auf die Entwicklung der Versuchstiere und die Ausbildung von Skelettdefekten zu gewinnen, wurde die Entwicklung von lebenden exponierten *B.rerio* und *X.laevis* über einen gewissen Zeitraum verfolgt und mit Kontrolltieren verglichen.
Aufgrund der Transparenz der Hülle ist auch die frühe Entwicklung von Fischeiern dem Forscher mit Hilfe eines Binokulars zugänglich. Dadurch konnten die für die Versuche gewünschten Stadien erkannt werden, in denen die Applikation eines Detergens erfolgen sollte. Nach Abschluß eines Versuchs konnten sich sowohl Tiere mit Detergenskontakt während des Versuchs, als auch Kontrolltiere in normalem Aquarienwasser weiterentwickeln.
Zur vorübergehenden Fixierung geschlüpfter Larven und größerer Jungtiere unter dem Binokular empfahl sich die Anwendung einer 5%igen Urethan-Lösung, in die die Tiere wenige Minuten überführt wurden. In dieser schwachen Konzentration hat das Urethan einen narkotisierenden Einfluß auf das Tier, ohne es dabei zu töten. Nach Überführung in Wasser wurden die Tiere nach wenigen Augenblicken wieder aktiv und konnten sich so unbeschadet weiterentwickeln.

2.5.2 Anfertigung von Totalpräparaten

2.5.2.1 Tötung und Fixierung

Zur Untersuchung anatomischer Auffälligkeiten exponierter Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren wurden geschlüpfte Larven und Jungtiere zum gewünschten Zeitpunkt mit Hilfe einer 10%igen Urethan-Lösung getötet. Das Urethan hat neben der narkotisierenden und in 10%iger Konzentration letalen Wirkung einen Effekt auf die Muskulatur der Tiere, der zu einer vollständigen Streckung der Extremitäten und des gesamten Körpers führt, die die weitere Präparation bzw. Untersuchung durchaus erleichtern kann. Getötete Tiere wurden zur weiteren Präparation oder Aufbewahrung aus der Urethan-Lösung genommen und mit destilliertem Wasser gespült.
Anschließend wurden Tiere, die als Färbe- oder Schnittpräparate dienen sollten, in 4%ige Formaldehyd-Lösung, Anschauungsobjekte ohne weitere Präparation in 70%iges Ethanol überführt.

2.5.2.2 Färbungen

2.5.2.2.1 Mazeration und Aufhellung

Vor der weiteren Präparation wurden die in 4%igem Formaldehyd fixierten Tiere für 24 Stunden in destilliertes Wasser überführt.
Zur Mazeration wurde das Wasser anschließend durch eine 2%ige, wäßrige Kaliumhydroxid (KOH)-Lösung ersetzt. In dieser wurden die Tiere 48-96 Stunden mazeriert und aufgehellt. Dabei ist regelmäßige optische Kontrolle notwendig, da die Objekte bei zu langer Behandlung mit KOH zerfallen.

2.5.2.2.2 Alizarinfärbung des Skeletts nach SPALTEHOLZ

Sobald die Tiere begannen glasig-transparent zu werden, wurden einige Tropfen 2%ige wäßrige Alizarin-Rot-S-Lösung (Merck, Nr.6279) zur KOH-Lösung gegeben.
Alizarin (1,2-Dihydroxy-anthrachinon, $C_{14}H_8O_4$) ist ein roter Farbstoff aus der Krappwurzel (*Rubia tinctorum*), in der er, verbunden mit zwei Glucosemolekülen, als

Ruberythrinsäure vorkommt. Da er hohe Affinität zum Calcium des Knochens besitzt, kann dieser angefärbt werden, ohne daß das Weichgewebe die rote Farbe annimmt.
Mit dem Stereomikroskop wurde die Intensität der Knochenfärbung in der Folge überprüft, wofür die Objekte für kurze Zeit in Petrischälchen überführt wurden. Falls die Präparate den gewünschten Farbton noch nicht erreicht hatten, wurde die KOH-Alizarin-Lösung erneuert.
Durch Übertragung in destilliertes Wasser wurde der Färbevorgang unterbrochen
Im Anschluß an mehrfache Spülung mit *Aqua destillata* für 1-3 Stunden wurden die Objekte in einer aufsteigenden Alkoholreihe etwa 2 Stunden entwässert. War diese abgeschlossen, mußten die Präparate *in toto* in ein Medium überführt werden, das langfristig nicht zu einem Ausbleichen der gefärbten Skelettanteile führt. Obwohl in der Literatur Glycerin als Dauermedium beschrieben wird, empfahl sich 50%iger Ethanol als langfristig besseres Konservierungsmittel, da es zu einem geringeren Verlust an Farbintensität führte.

2.5.3 Anfertigung von histologischen Präparaten

2.5.3.1 Fixierung, Entwässerung und Paraffinierung

Bevor das zytologische Detail als mikroskopisches Bild vorliegt, sind zahlreiche Behandlungen der Objekte notwendig, die nachfolgend beschrieben werden sollen.
Für die Herstellung der Schnittpräparate wurden alle beschriebenen Stadien der beiden Versuchstiere verwendet, die nach Tötung durch eine 10%ige Urethanlösung für mindestens 24 Stunden *in toto* in BOUIN`scher Lösung fixiert wurden. Diese setzt sich aus gesättigter, wäßriger Pikrinsäure, Formaldehyd und Eisessig zusammen und ist besonders für die Fixierung von Embryonen geeignet. BOUIN`sche Fixierlösung führt nur zu einer 2,5%igen Schrumpfung des Gewebes, das nach der Fixation gut färbbar ist (BOUIN 1897). Nach kurzem Spülen in *Aqua destillata* konnten die Embryonen bzw. Jungtiere getrennt in Gläschen mit destilliertem Wasser übertragen werden. Anschließend wurden sie in einer aufsteigender Dioxan-Reihe, wie unten beschrieben, entwässert.

Tab.16: Fixierung, Entwässerung und Paraffinierung

BOUIN`sche Fixierlösung	24 h
Aqua destillata	10 min
Dioxan 30%ig *	10 min
Dioxan 50%ig *	10 min
Dioxan 70%ig *	10 min
Dioxan 100%ig *	10 min
Dioxan-Paraffin-Gemisch (1:2) **	24 h
Paraffin I **	24 h
Paraffin II **	24 h

* Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf wäßrige Lösungen.

** bei 60°C im Thermoschrank

Dioxan ($C_4H_8O_2$) gestattet die Ausschaltung von Alkohol, da es sich mit Wasser wie Xylol in jedem Verhältnis mischt (ROMEIS, 1968). Auf diese Weise wurde eine Schrumpfung des Gewebes, die für Alkohole wie Ethanol oder Isopropanol charakteristisch ist und das zelluläre Bild verfälschen kann, umgangen. Nach vollendeter Dehydrierung wurden die Präparate in ein Gemisch aus Dioxan und Paraffin im Verhältnis 1:2 gegeben, wo sie mindestens 24 Stunden verblieben. Eine zweifache Paraffin-Behandlung sorgte anschließend für ein vollkommen dioxanfreies Gewebe. Paraffine sind gesättigte Kohlenwasserstoffe mit einer Kettenlänge von mindestens C_{20} , die bei Raumtemperatur fest sind. Daher fand die Paraffinierung grundsätzlich im Thermoschrank bei einer Temperatur von 60°C statt, oberhalb derer sich das Paraffin verflüssigt. Die Schneidbarkeit wird durch die Paraffinierung enorm verbessert , ohne daß das chemisch inaktive Alkan Reaktionen mit anderen Substanzen eingeht (*„par affinis“*). Die Durchtränkung dauerte bei Objekten von einigen Millimetern Größe, wie im Falle von Embryonen, mindestens 1-2 Tage. Danach konnten die Präparate mit Hilfe einer Impföse in kleine Metalltöpfe übertragen werden, die zuvor mit Glycerin bepinselt worden waren. Die Gefäße wurden daraufhin mit flüssigem histologischem Paraffin (LEICA-Histowachs, Schmelzpunkt 57-58°C) gefüllt.

Um einer ungleichmäßigen Erhärtung des Paraffins Einhalt zu gebieten, wurde die Oberfläche einige Minuten mit Hilfe eines erhitzten Spatels flüssig gehalten. Das nach 48 Stunden vollkommen ausgehärtete Histowachs wurde mit einer Rasierklinge auf

Form eines viereckigen Kegelstumpfes getrimmt und mit wenig flüssigem Paraffin auf kleine Holzblöcke geklebt. Im Anschluß konnten am Mikrotom 3 µm dicke Schnitte im Winkel von 5° angefertigt werden.
Die Schnittbänder wurden mit einem angefeuchteten Pinsel vorsichtig auf Objektträger überführt, die nach Alkohol-Reinigung mit Serum-Glycerin bestrichen und danach mit destilliertem Wasser benetzt worden waren. Zur Kennzeichnung der Objektträger wurde ein Diamantschreiber verwendet, dessen Markierung chemischen Einflüssen standhält. Zur vollständigen Trocknung wurden die Präparate auf eine 40°C warme Heizplatte gelegt, um anschließend zur Streckung und Fixierung der Schnitte an den Objektträger für 24 Stunden in einem ebenfalls 40°C warmen Thermoschrank gelagert zu werden.

2.5.3.2 Modifizierte Azan-Färbung nach HEIDENHAIN

Zur Differenzierung der verschiedenen Gewebetypen wurde eine modifizierte Azan-Färbung nach HEIDENHAIN durchgeführt. Die Azan-Färbung stellt eine ausgezeichnete Bindegewebs- und Übersichtsfärbung dar. Ihr Name wurde aus der Abkürzung der ursprünglich verwendeten Farbstoffe Azocarmin G und Anilinblau gebildet (ADAM & CZIHAK 1964).
Zunächst wurden die Schnittpräparate zur Lösung des Paraffins zweimal für mindestens 10 Minuten in Xylol getränkt, um danach durch eine absteigende Ethanolreihe auf Wasserbasis gebracht zu werden. Im folgenden ersten Färbeschritt wurde eine Rottönung der Zellkerne angestrebt. Ursprünglich verwendete man dazu eine wäßrige Azokarmin G-Lösung. Sie kann -wie im vorliegenden Fall- durch eine 5%ige Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung ersetzt werden. Dieser Farbstoff führt zu einer ausgezeichneten rote Kernfärbung, die einer guten Karminfärbung gleicht, diese aber in der Einfachheit und Sicherheit der Anwendung übertrifft (ROMEIS 1968). Zur Herstellung von 100 ml Lösung wurden 0,1 g Kernechrot in 100 ml 5%iger wäßriger Aluminiumsulfatlösung heiß aufgelöst.
Nach kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnittpräparate zur Beizung des Bindegewebes in eine 5%ige wäßrige Phosphorwolframsäure-Lösung gegeben. Erneutes Spülen mit *Aqua destillata* führte schließlich zum zweiten Färbeschritt mit Anilinblau. Aus 100 ml destilliertem Wasser, 0,5 g wasserlöslichem Anilinblau, 2 g Orange G und 8 ml Essigsäure wurde eine Lösung hergestellt, die kollagenes und retikuläres Bindegewebe blau erscheinen ließ.

Über eine aufsteigende Ethanolreihe konnten die Präparate wieder entwässert und in zwei Stufen des Intermediums Xylol auf die Einbettung in Entellan vorbereitet werden.

Tab.17: Modifizierte Azan-Färbung nach HEIDENHAIN

1	Xylol I	10 min
2	Xylol II	10 min
3	Isopropanol	5 min
4	Ethanol, 96%ig *	5 min
5	Ethanol, 85%ig *	5 min
6	Ethanol, 70%ig *	5 min
7	Ethanol, 50%ig *	5 min
8	Ethanol, 30%ig *	5 min
9	*Aqua destillata*	30 s
10	Kernechtrot-Aluminiumsulfat	30 min
11	*Aqua destillata*	30 s
12	Phosphor-Wolframsäure, 5%ig*	7 min
13	*Aqua destillata*	30 s
14	Anilinblau-Orange G	50 min
15	*Aqua destillata*	30 s
16	*Aqua destillata*	30 s
17	Ethanol, 30%ig *	30 s
18	Ethanol, 50%ig *	30 s
19	Ethanol, 70%ig *	30 s
20	Ethanol, 85%ig *	30 s
21	Ethanol, 96%ig *	1 min
22	Isopropanol	1 min
23	Xylol I	10 min
24	Xylol II	10 min

* Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf wäßrige Lösungen

3 Ergebnisse

3.1 Embryotoxikologische Versuche

In den teratologischen Testserien wurden verschiedene Konzentrationen von Detergentien hinsichtlich ihrer Wirkung auf Embryonen des Zebrabärblings *Brachydanio rerio* getestet.
Alle toxikologischen Tests wurden mit dem Vollwaschmittel ARIEL durchgeführt. Zum Vergleich wurden außerdem Versuche mit dem Feinwaschmittel PERWOLL gemacht.
Die toxikologischen Tests wurden zum einen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen zu Versuchsbeginn durchgeführt, wobei spezifische Entwicklungsstadien für die Versuche ausgewählt wurden.
Zum anderen wurde in die Auswertung der Testserien der Faktor Expositionszeit einbezogen, d.h. die Embryonen wurden für unterschiedliche, aber definierte Zeiten den einzelnen Konzentrationen des Detergens ausgesetzt.
Als Ergebnis der teratologischen Untersuchungen sollten Aussagen über die Überlebensfähigkeit der Fischembryonen in Gegenwart von grenzflächenaktiven Substanzen, sowie deren Wirkung auf die Schlüpffähigkeit überlebender Larven, möglich sein. Diese Effekte lassen letztlich Rückschlüsse auf das toxische Potential der getesteten Substanz zu.

3.1.1 Prozentuale Sterblichkeit

Bei der Berechnung der Prozentualen Sterblichkeit wurde ermittelt, wieviele der zu Versuchsbeginn eingesetzten Fischembryonen nach 24 Stunden überlebt hatten.
Die toxikologischen Tests wurden in Abhängigkeit von den verschiedenen Konzentrationen des Detergens, der Zugehörigkeit der Embryonen zu einem der Entwicklungsstadien 10, 12 oder 16, sowie der Expositionszeit von 1 bzw. 24 Stunden durchgeführt.

3.1.1.1 Untersuchungen zur Prozentualen Sterblichkeit nach 1-stündiger Exposition

Die Fischembryonen in diesem Teil der Arbeit wurden nur für einen kurzen Zeitraum von einer Stunde den verschiedenen Konzentrationen des Detergens ausgesetzt, das anschließend gegen Wasser ausgetauscht wurde. Gezählt wurden tote bzw. lebende Fische nach 24 Stunden.

Die Testserien mit der Expositionszeit 1 Stunde wurden mit Fischembryonen des Entwicklungsstadiums 12 durchgeführt.

Tab.18: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition

Stadium 12 1h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		160	28	17,5
	0,004	-0,397940009	160	29	18,125
	0,012	0,079181246	160	26	16,25
	0,02	0,301029996	160	121	75,625
	0,04	0,602059991	160	160	100
			800		

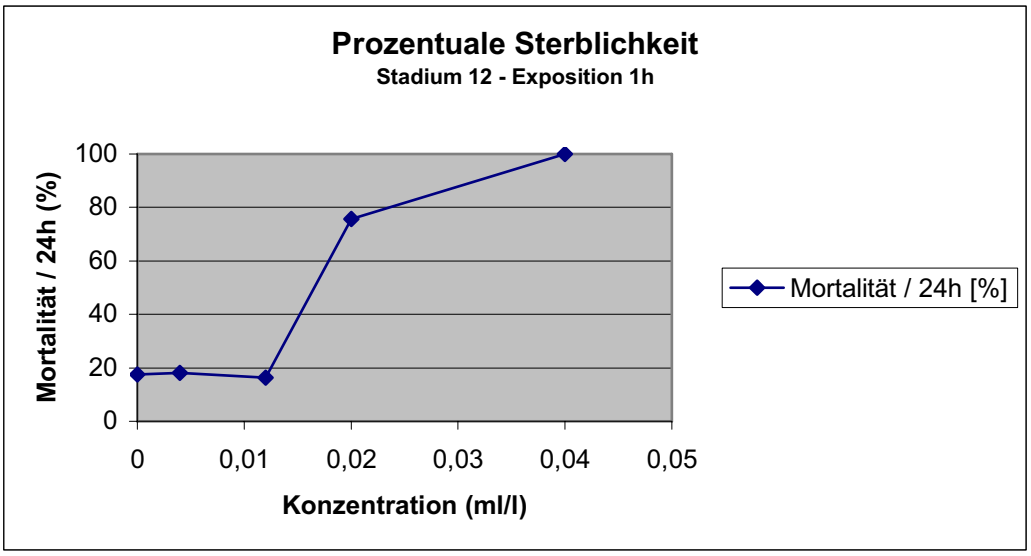


Abb.10: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition

Die in Abb.10 dargestellte Kurve zeigt erst zur zweithöchsten Detergens-Konzentration von 0,02 ml/l hin einen starken Anstieg der prozentualen Sterblichkeit auf etwa 75%. Die Effekte der schwächeren Konzentrationen sind bei 0,004 ml/l nur wenig stärker, bei 0,012 ml/l sogar geringer als bei den Kontrollen ohne Detergens und daher vernachlässigbar. Nach Applikation der höchsten Konzentration von 0,04 ml/l waren nach 24 Stunden alle Versuchstiere gestorben.

3.1.1.2 Untersuchungen zur Prozentualen Sterblichkeit nach 24-stündiger Exposition

Die Ergebnisse des folgenden Teils beziehen sich allesamt auf lange Expositionszeiten von 24 Stunden. Nach dieser Zeitspanne wurden tote und überlebende Fische gezählt und die Lösungen gegen Wasser ausgetauscht.
Als Testembryonen dienten Zebrafische, die sich zu Versuchsbeginn in den Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 befanden.

Tab.19: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 nach 24-stündiger Exposition

Stadium 10 24h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		96	20	20,833
	0,004	-0,397940009	96	25	26,042
	0,008	-0,096910013	96	25	26,042
	0,016	0,204119983	96	82	85,417
	0,032	0,505149978	96	96	100
			480		

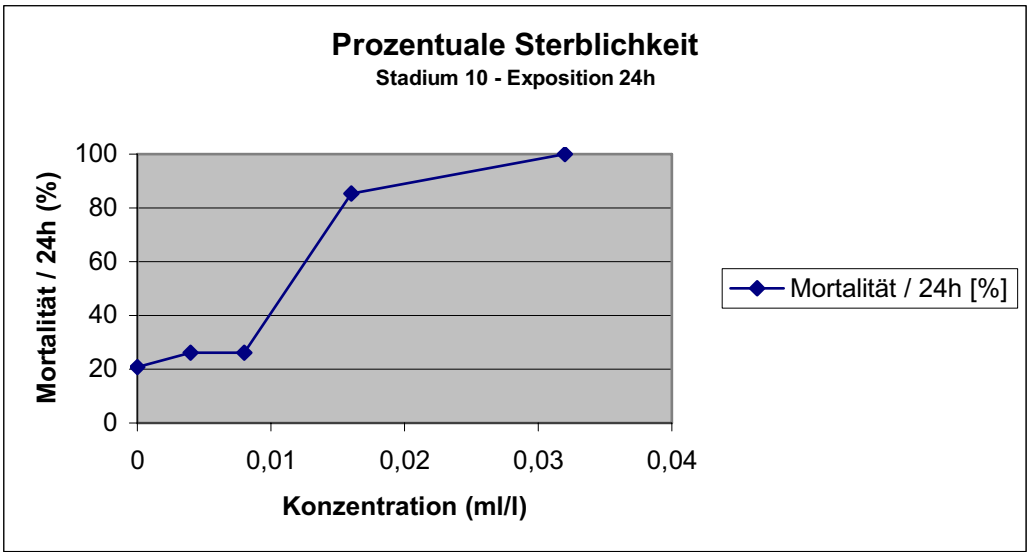


Abb.11: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 nach 24-stündiger Exposition

Ähnlich wie in den 1-Stunden-Versuchen des Entwicklungsstadiums 12 zeigten auch in den Versuchen mit Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 die zwei schwächsten Konzentrationen des Detergens bei einer Expositionszeit von 24 Stunden nur wenig deutlichere Effekte als in den Kontrollen ohne Waschmittel. Allerdings muß beachtet werden, daß in diesen Testreihen auch geringere Konzentrationen zum Einsatz kamen.

Zu einer deutlichen Zunahme der Mortalität kam es – wie in Abb.11 dargestellt – bei einer Konzentration zwischen 0,008 und 0,016 ml/l.

Der zuletzt genannten Konzentration erlagen nach 24 Stunden über 85% der Versuchstiere. Die Fische der Lösungen mit dem höchsten Detergensanteil waren nach demselben Zeitraum alle gestorben.

Tab.20: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 24-stündiger Exposition

Stadium 12 24h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		160	22	13,75
	0,004	-0,39794001	160	19	11,875
	0,012	0,079181246	160	79	49,375
	0,02	0,301029996	160	150	93,75
	0,04	0,602059991	160	160	100
			800		

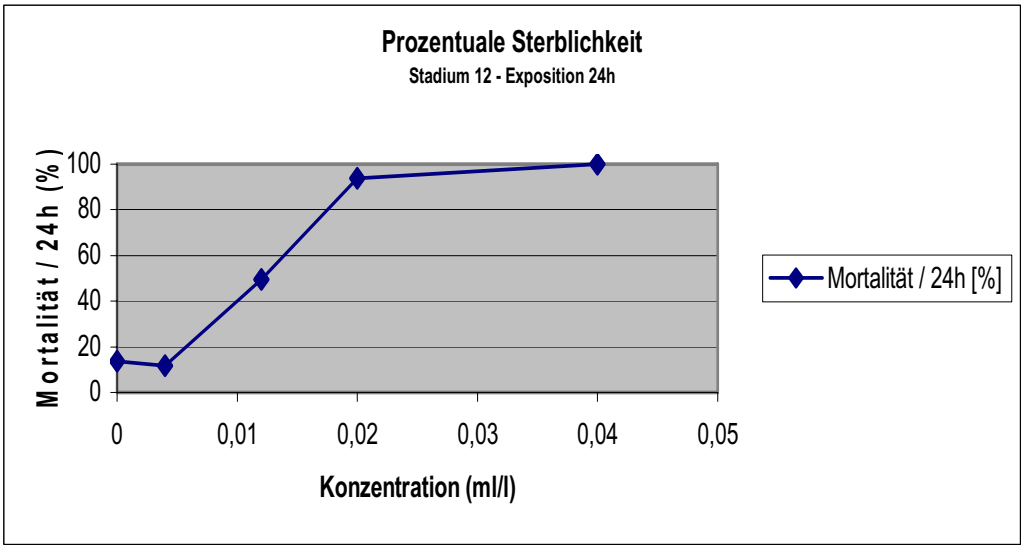


Abb.12: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 24-stündiger Exposition

Die hier verwendeten Konzentrationen sind dieselben wie in den 1-Stunden-Versuchen des Entwicklungsstadiums 12. Die Auswirkungen der mit 0,004 ml/l am schwächsten konzentrierten Lösung sind mit 11,875% in Bezug auf die Mortalität der Fischembryonen geringer als bei der Kontrollgruppe ohne Detergens, deren 24-Stunden-Mortalität bei 13,75% liegt.

Abb.12 zeigt aber einen sichtbaren Anstieg der prozentualen Mortalität bereits zu einer Konzentration von 0,012 ml/l hin. Bei dieser zweithöchsten Verdünnung war knapp die Hälfte der Fischembryonen nach 24 Stunden tot. Mit nahezu 94% waren es bei der nächsthöheren Konzentration von 0,02 ml/l fast alle Versuchstiere. 100% starben durch 24-stündigen Kontakt mit einer Waschmittellösung der Konzentration 0,04 ml/l.

Tab.21: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 nach 24-stündiger Exposition

Stadium 16 24h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		25	0	0
	0,012	0,079181246	25	1	4
	0,036	0,556302501	25	18	72
	0,06	0,77815125	25	25	100
	0,12	1,079181246	25	25	100
			125		

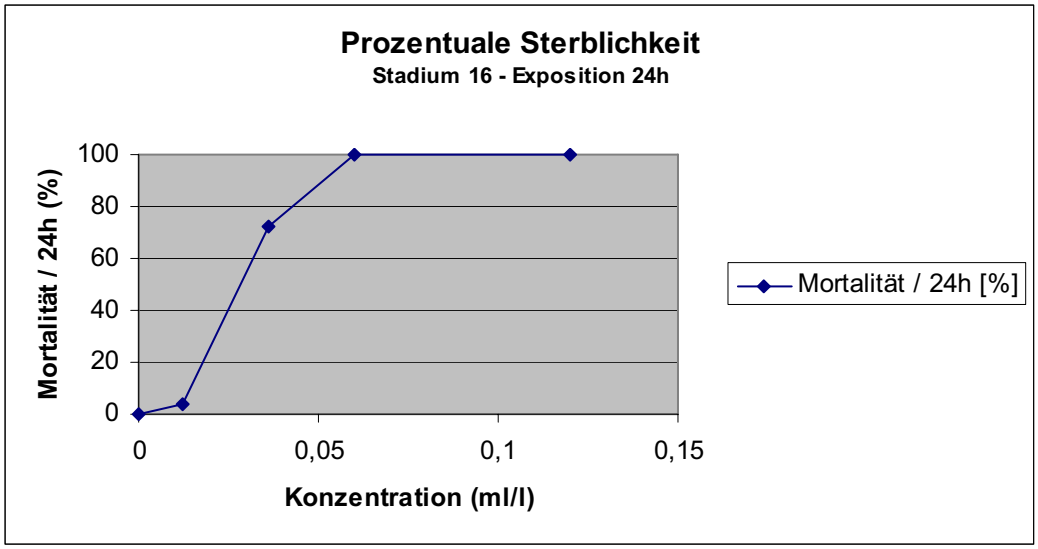


Abb.13: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 nach 24-stündiger Exposition

Für die Auswertung der Versuche mit Fischen des Entwicklungsstadiums 16 sei darauf hingewiesen, daß hier wiederum höhere Konzentrationen des Detergens als in den vorangegangenen Testserien verwendet wurden.

Die leicht erhöhte Sterblichkeit der Fische durch die niedrigste Konzentration von 0,012 ml/l kam vermutlich zufällig zustande. Aufgrund ihrer geringen Abweichung von den Ergebnissen der Kontrollgruppe lag ihr vermutlich kein Einfluß des Waschmittels zugrunde.

Anders präsentieren sich die Ergebnisse der nächsthöheren Konzentration von 0,036 ml/l. Hier waren nach Versuchsende, also nach 24 Stunden, nur noch 18% der Versuchstiere lebendig. Die höheren Konzentrationen des Waschmittels führten zu einer Sterblichkeit von jeweils 100%.

3.1.1.3 Vergleich der Prozentualen Sterblichkeiten bei unterschiedlichen Expositionszeiten

Tab.22: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition

Stadium 12 1h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		160	28	17,5
	0,004	-0,397940009	160	29	18,125
	0,012	0,079181246	160	26	16,25
	0,02	0,301029996	160	121	75,625
	0,04	0,602059991	160	160	100
			800		

Stadium 12 24h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		160	22	13,75
	0,004	-0,39794001	160	19	11,875
	0,012	0,079181246	160	79	49,375
	0,02	0,301029996	160	150	93,75
	0,04	0,602059991	160	160	100
			800		

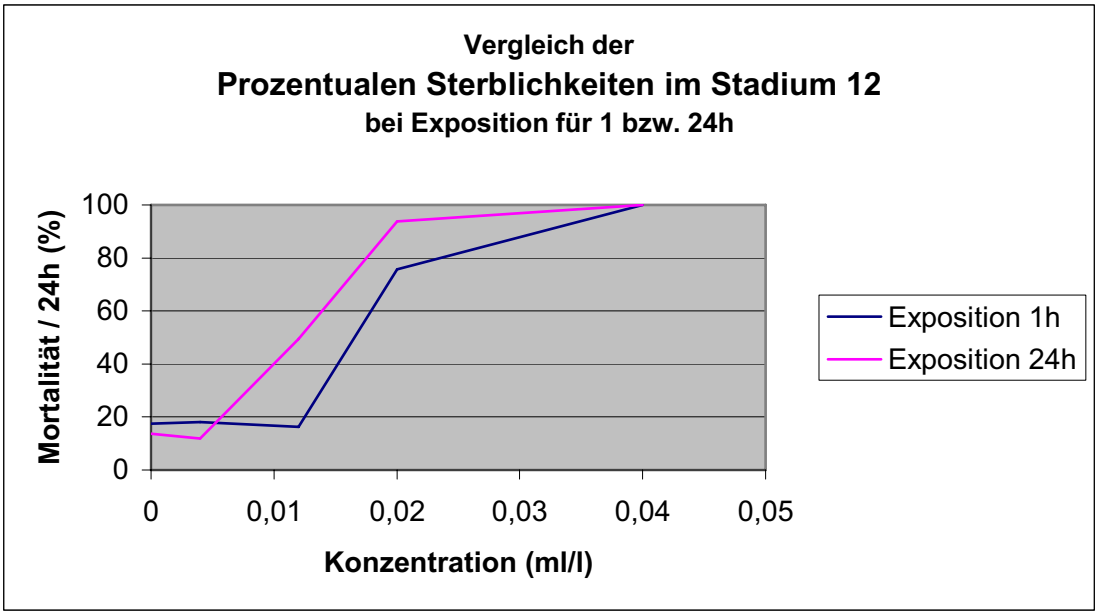


Abb.14: Prozentuale Sterblichkeiten von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition

In Abb.14 ist der direkte Vergleich der Mortalitäten von Embryonen des späten Blastulastadiums nach Exposition für 1 bzw. 24 Stunden graphisch dargestellt.
Bei der Betrachtung der Kurvenverläufe wird ersichtlich, daß die Kurve der Versuche mit einstündiger Applikation des Waschmittels in den mittleren Konzentrationsbereichen deutlich unterhalb der aus den 24-Stunden-Versuchen ermittelten Kurve verläuft.
Die letalen Effekte des Detergens scheinen folglich in den Versuchen mit einstündiger Exposition in geringerem Maße und grundsätzlich erst bei höheren Konzentrationen in Erscheinung getreten zu sein.
Da außer der Expositionszeit alle Größen wie Entwicklungsstadium, Konzentrationen etc. in den Versuchen gleich waren, kommt für den beobachteten Effekt nur diese in Frage. Die Expositionszeit steht folglich mit der Mortalität der Embryonen in einem positiv korrelierenden Zusammenhang.

3.1.1.4 Vergleich der Prozentualen Sterblichkeiten verschiedener Entwicklungsstadien

Tab.23: Prozentuale Sterblichkeiten von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24-stündiger Exposition

Stadium 10 24h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		96	20	20,833
	0,004	-0,397940009	96	25	26,042
	0,008	-0,096910013	96	25	26,042
	0,016	0,204119983	96	82	85,417
	0,032	0,505149978	96	96	100
			480		

Stadium 12 24h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		160	22	13,75
	0,004	-0,39794001	160	19	11,875
	0,012	0,079181246	160	79	49,375
	0,02	0,301029996	160	150	93,75
	0,04	0,602059991	160	160	100
			800		

Stadium 16 24h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		25	0	0
	0,012	0,079181246	25	1	4
	0,036	0,556302501	25	18	72
	0,06	0,77815125	25	25	100
	0,12	1,079181246	25	25	100
			125		

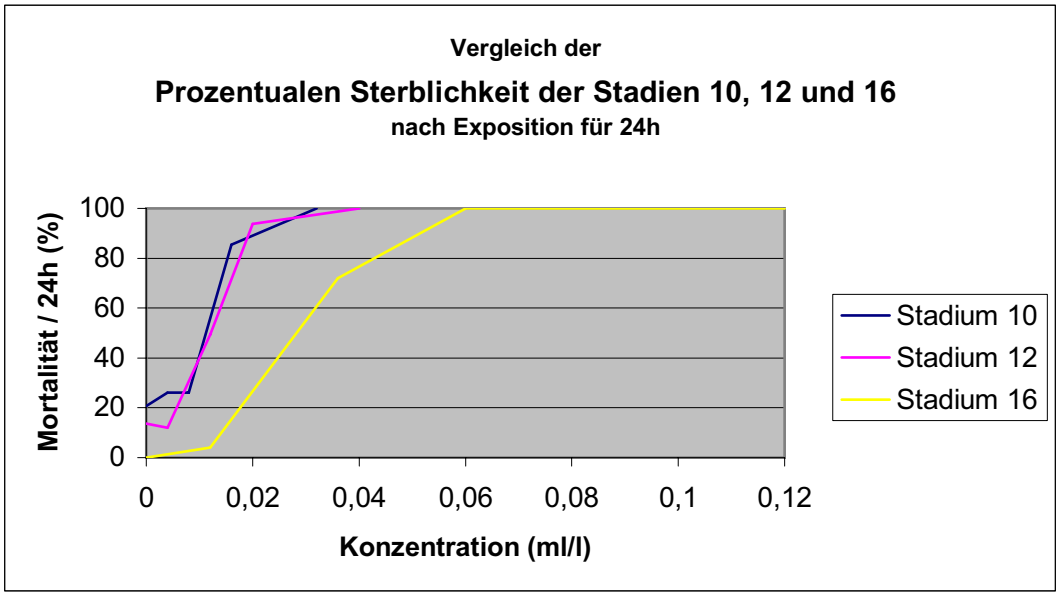


Abb.15: Prozentuale Sterblichkeiten von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24 -stündiger Exposition

In Abb.15 wurden die Prozentualen Mortalitäten von Embryonen aller untersuchten Entwicklungsstadien nach Exposition für 24 Stunden graphisch dargestellt.

Es fällt auf, daß die Sterblichkeiten der Embryonen der frühen und späten Blastulaphase zahlenmäßig offenbar keinen signifikanten Unterschied aufweisen, da die Kurven weitgehend gleich verlaufen.

Deutlicher werden die Unterschiede des Kurvenverlaufs des Entwicklungsstadiums 16 verglichen mit den Erstgenannten. Effekte treten hier erst bei deutlich höheren Konzentrationen in Erscheinung. Die Kurve des Entwicklungsstadiums 16 verläuft daher in den mittleren der dargestellten Konzentrationsbereiche weit unterhalb der Kurven der früheren Stadien.

Mit dem Voranschreiten der Embryonalentwicklung, in diesem Fall in der Phase der Blastulation und anschließenden Gastrulation scheint somit eine Zunahme der Widerstandsfähigkeit der Embryonen bezogen auf die Noxe Detergens einherzugehen.
Die Zunahme des Alters der Fische steht folglich, zumindest in diesem Abschnitt der Ontogenese, mit der Resistenz gegenüber Detergentien in einem positiv korrelierenden Zusammenhang.

3.1.1.5 Vergleich der Prozentualen Sterblichkeiten bei verschiedenen Waschmitteltypen

Zum Vergleich mit dem Vollwaschmittel ARIEL wurde das Fein- bzw. Wollwaschmittel PERWOLL auf seine Embryotoxizität in Bezug auf Fischembryonen des Entwicklungsstadiums 12 bei 1-stündiger Exposition hin untersucht.

Tab.24: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition mit ARIEL

Stadium 12 1h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		160	28	17,5
	0,004	-0,397940009	160	29	18,125
	0,012	0,079181246	160	26	16,25
	0,02	0,301029996	160	121	75,625
	0,04	0,602059991	160	160	100
			800		

Tab.25: Prozentuale Sterblichkeit des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition mit PERWOLL

Stadium 12 1 h	Konzentration c [ml/l]	log (c*100)	Anzahl Tiere	Mortalität / 24h	Mortalität / 24h [%]
	0		150	69	46
	0,008	-0,096910013	150	72	48
	0,029	0,462397998	150	63	42
	0,044	0,643452676	150	118	78,667
	0,08	0,903089987	150	150	100
			750		

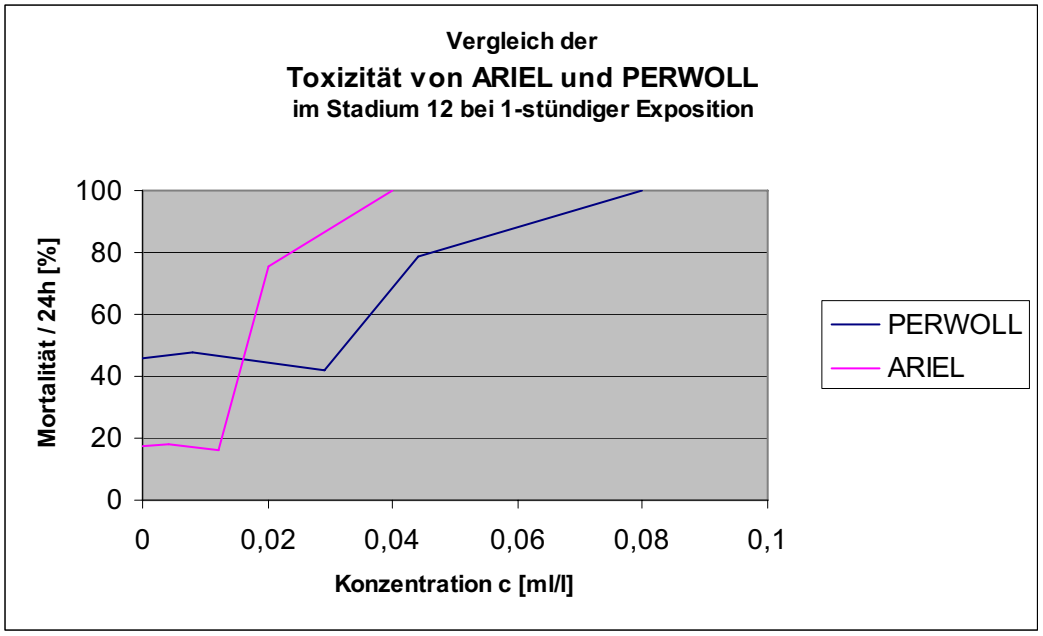


Abb.16: Vergleich der Toxizität von ARIEL und PERWOLL auf Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 bei 1-stündiger Exposition

Aus Abb.16 wird ersichtlich, daß ARIEL als Vollwaschmittel über eine deutlich höhere Toxizität verfügt als das Feinwaschmittel PERWOLL. Zwar ist in den unteren Konzentrationsbereichen zumindest in den durchgeführten Versuchen eine höhere Mortalität auf Seiten des Feinwaschmittels zu verzeichnen, doch liegt dies eher an der schwankenden Laichgüte als am eingesetzten Agens. Dies ist insofern als zufälliges Phänomen zu werten und ist damit expositionsunabhängig.

Auffällig ist jedoch wiederum die im Vergleich mit den Kontrollgruppen ohne Detergens geringfügig abnehmende Sterblichkeit der Embryonen in den unteren Konzentrationsbereichen. Besonders deutlich wird diese Tendenz im Falle des Feinwaschmittels PERWOLL. Hier liegt die Mortalität der Fischembryonen ohne Detergens im 1-Stunden-Versuch bei 46%, im Falle einer einstündigen Exposition mit PERWOLL der Konzentration 0,029 ml/l jedoch nur bei 42%. Auch die Sterblichkeit der mit ARIEL getesteten Embryonen nimmt beim Vergleich der Kontrollen und der mit 0,012 ml/l zweitniedrigsten Konzentration von ARIEL geringfügig von 17,5% auf 16,25% ab. Hier haben die gering dosierten Waschmittel offenbar eine limitierende Wirkung auf andere, die Embryogenese negativ beeinflussende Faktoren.

Der Unterschied zwischen beiden untersuchten Detergentien wird in den mittleren und oberen Konzentrationsbereichen sichtbar. Schon bei einer Konzentration von etwa 0,02 ml/l hat das Vollwaschmittel zu einer Mortalität nahe 80% geführt, während

PERWOLL in diesem Bereich zu einer Sterblichkeit auf dem Niveau der Kontrollen führt, insofern ohne Wirkung in Bezug auf die Sterblichkeit bleibt.
ARIEL führte in gleichem Maße schon bei einer Konzentration von 0,04 ml/l zum Tod aller Versuchstiere, was im Falle von PERWOLL erst bei der doppelten Dosis erreicht war.

3.1.2 Letale Dosis (LD_{50})

Der LD_{50}-Wert beschreibt die Konzentration der eingesetzten Substanz, bei der nach 24 Stunden 50% der Versuchstiere gestorben sind. Er wurde für alle untersuchten Entwicklungsstadien bei einer Exposition für 24 Stunden bestimmt, beim Entwicklungsstadium 12 außerdem für die Expositionszeit 1 Stunde.

3.1.2.1 Vergleich der LD_{50}-Werte bei unterschiedlichen Expositionszeiten

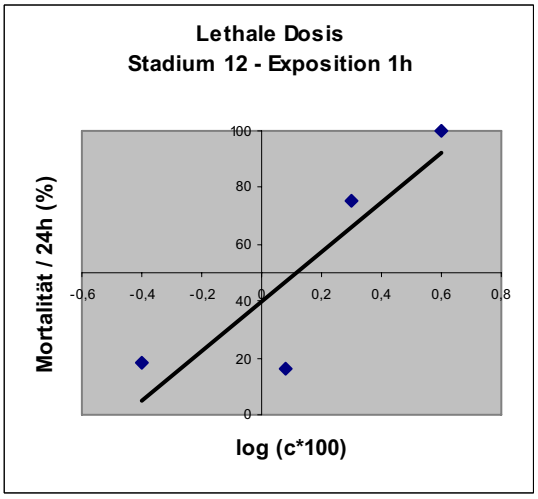


Abb.17: LD_{50}, Entw.stadium 12, Exposition 1h

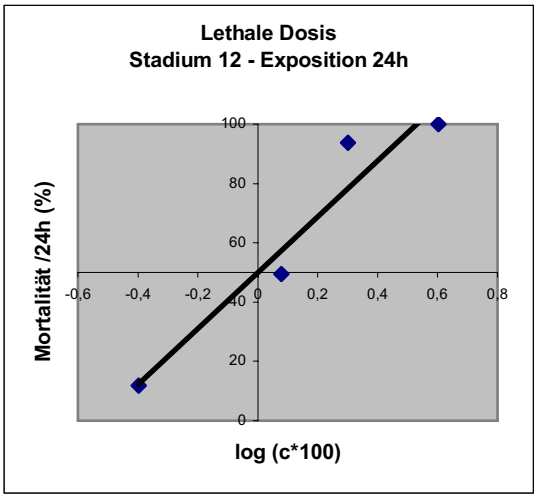


Abb.18: LD_{50}, Entw.stadium 12, Exposition 24h

Tab.26: LD_{50}-Werte von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition

	Entwicklungsstadium 12	
Expositionsdauer	1h	24h
Letale Dosis [ml/l]	0,0131	0,0100

Die Mortalität der Fischembryonen korreliert, wie oben beschrieben, positiv mit der Expositionsdauer. Diesen Zusammenhang zeigt auch der anhand der 1-Stunden-Versuche für das Entwicklungsstadium 12 berechnete LD_{50}-Wert aus Tab.26, der sich mit 0,0131 ml/l signifikant vom LD_{50}-Wert der Versuche mit 24 Stunden exponierten Tieren unterscheidet. Die Überlebensfähigkeit der Embryonen sinkt somit antiproportional zur Dauer der Exposition.

3.1.2.2 Vergleich der LD_{50}-Werte verschiedener Entwicklungsstadien

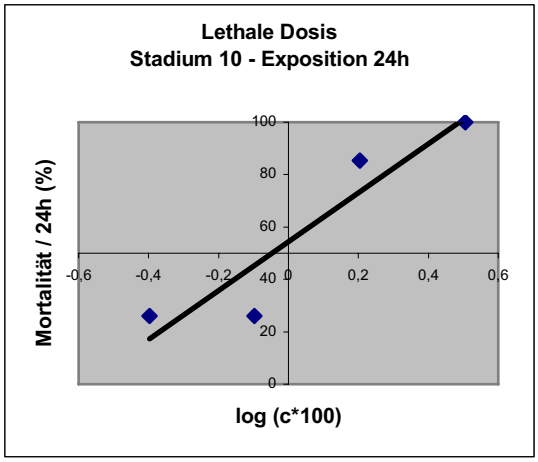


Abb.19: LD_{50}, Entw.stadium 10, Exposition 24h

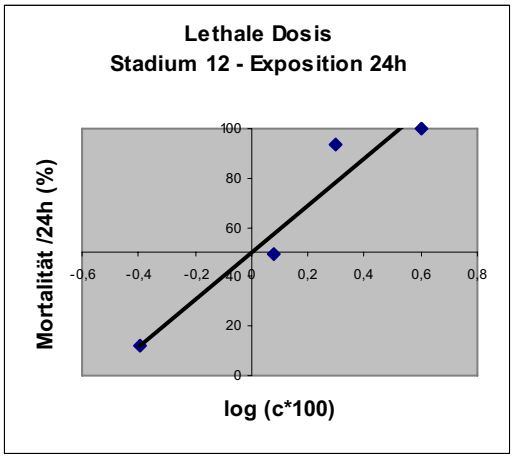


Abb.20: LD_{50}, Entw.stadium 12, Exposition 24h

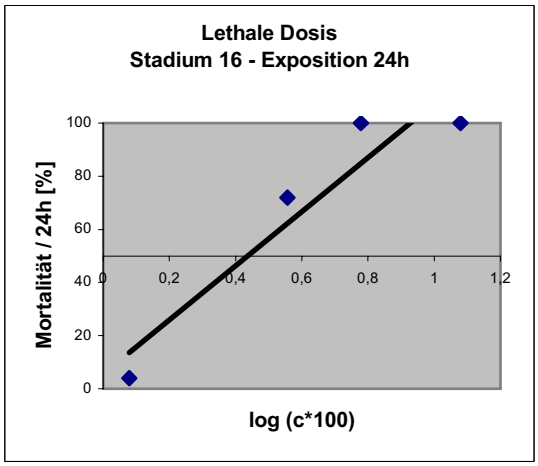


Abb.21: LD_{50}, Entw.stadium 16, Exposition 24h

Tab.27: LD_{50}-Werte von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24-stündiger Exposition

	Entw.stadium 10	**Entw.stadium 12**	**Entw.stadium 16**
Expositionsdauer	24 h	24 h	24 h
Letale Dosis [ml/l]	0,0089	0,0100	0,0273

Wie bereits oben beschrieben, zeigt das Detergens hinsichtlich der Mortalität der Tiere der frühen Blastulaphase, also des Entwicklungsstadiums 10, keinen signifikanten Unterschied zu denen der späten Blastula auf. Dies wird auch bei Betrachtung der in Tab.27 aufgeführten LD_{50}-Werte deutlich, die mit 0,0089 und 0,01 ml/l nah beieinander liegen.

Der LD_{50}-Wert des Entwicklungsstadiums 16, der späten Gastrula, liegt mit 0,0273 ml/l mehr als zweieinhalbmal so hoch, und unterscheidet sich daher signifikant von den Blastulastadien.

3.1.3 Empfindlichkeitsbereiche

Der Empfindlichkeitsbereich eines Organismus für eine Substanz ist der Konzentrationsbereich, in dem die Substanz den Organismus nachweisbar beeinträchtigt, ihn jedoch nicht tötet.

In der Auswertung der toxikologischen Versuche wurde in diesem Zusammenhang als untere Grenze, in der die eingesetzte Substanz sozusagen effektlos blieb, als die Konzentration festgesetzt, bei der - den natürlicherweise, also auch in den Kontrollen gestorbenen Anteil der Fische vorausgesetzt - alle übrigen Versuchstiere über den fünften Tag hinaus überlebten.

Die untere Grenze stellt die Konzentration dar, bei der nach 24 Stunden bereits alle Versuchstiere gestorben waren, da höhere Konzentrationen nur noch zu einer Beschleunigung, nicht jedoch zu einer Erhöhung der bereits maximalen Letalität führen.

3.1.3.1 Vergleich der Empfindlichkeitsbereiche bei unterschiedlichen Expositionszeiten

Tab.28: Empfindlichkeitsbereiche für die Versuche mit 1- bzw. 24-stündiger Exposition

	Konzentrationsbereiche	
	Überleben aller Versuchstiere (über den 5.Versuchstag hinaus)	Tod aller Versuchstiere (nach 24 Stunden)
Entw.stadium 12 Exposition 1 h	0,012 ml/l	0,04 ml/l
Entw.stadium 12 Exposition 24 h	0,004 ml/l	0,04 ml/l

Die Betrachtung der in Tab.28 dargestellten Empfindlichkeitsbereiche des Entwicklungsstadiums 12 für die unterschiedlichen Expositionszeiten von 1 bzw. 24 Stunden läßt die bereits oben erwähnten Rückschlüsse auf den Zusammenhang von Expositionsdauer und prozentualer Mortalität der Tiere zu.

Bei kurzer Exposition zeigte selbst die Konzentration 0,012 ml/l noch keine erkennbaren Effekte bezogen auf die Sterblichkeit. Im 24-Stunden-Versuch war dies nur bei der schwächsten Konzentration von 0,004 ml/l der Fall.

Auswirkungen des Detergens auf die Embryonen manifestieren sich bei längeren Expositionszeiten somit bei geringeren Konzentrationen. Die Substanz zeigt bei langer Expositionsdauer einen insgesamt größeren Effektbereich.

3.1.3.2 Vergleich der Empfindlichkeitsbereiche verschiedener Entwicklungsstadien

Tab.29: Empfindlichkeitsbereiche für die Versuche mit 24-stündiger Exposition

	Konzentrationsbereiche	
	Überleben aller Versuchstiere (über den 5.Versuchstag hinaus)	Tod aller Versuchstiere (nach 24 Stunden)
Entw.stadium 10	0,008 ml/l	0,032 ml/l
Entw.stadium 12	0,004 ml/l	0,04 ml/l
Entw.stadium 16	0,012 ml/l	0,06 ml/l

Tab.29 stellt den Effektbereich des Waschmittels und somit den Empfindlichkeitsbereich der drei untersuchten Stadien bei einer Expositionsdauer von 24 Stunden dar.

Auf den ersten Blick scheinen sich die Effektbereiche der beiden Blastulastadien zu unterscheiden. Es muß allerdings beachtet werden, daß es sich bei den in Tab.29 dargestellten Empfindlichkeitsbereichen um Konzentrationsangaben handelt, die an die im Versuch tatsächlich eingesetzten Konzentrationen gebunden sind. Letztere wurden aber, wie bereits erwähnt, für die Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 unterschiedlich gewählt, da eine Steigerung der Widerstandsfähigkeit der Fischembryonen gegenüber der Noxe vorausgesetzt worden war. Insofern gibt der graphische Vergleich der Entwicklungsstadien 10 und 12 mehr Aufschluß über den gemeinsamen Effektbereich.

Dennoch wird in Tab.29 deutlich, daß das Entwicklungsstadium 16 unter den drei untersuchten Entwicklungsstadien der höchsten Waschmittelkonzentration bedarf, um Effekte hinsichtlich der Sterblichkeit der Versuchstiere zu zeigen.

3.1.4 Prozentualer Schlüpferfolg

Der Prozentuale Schlüpferfolg beschreibt den Anteil der zu Versuchsbeginn eingesetzten Fische, die nach 5 Tagen eigenständig die Eihülle verlassen hatten.

3.1.4.1 Untersuchungen zum Prozentualen Schlüpferfolg nach 1-stündiger Exposition

Tab.30: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition

Stadium 12 1h	Konzentration c [ml/l]	Anzahl Tiere	Geschlüpfte nach 5 Tagen	Schlüpferfolg [%]
	0	160	129	80,625
	0,004	160	125	78,125
	0,012	160	126	78,75
	0,02	160	30	18,75
	0,04	160	0	0
		800		

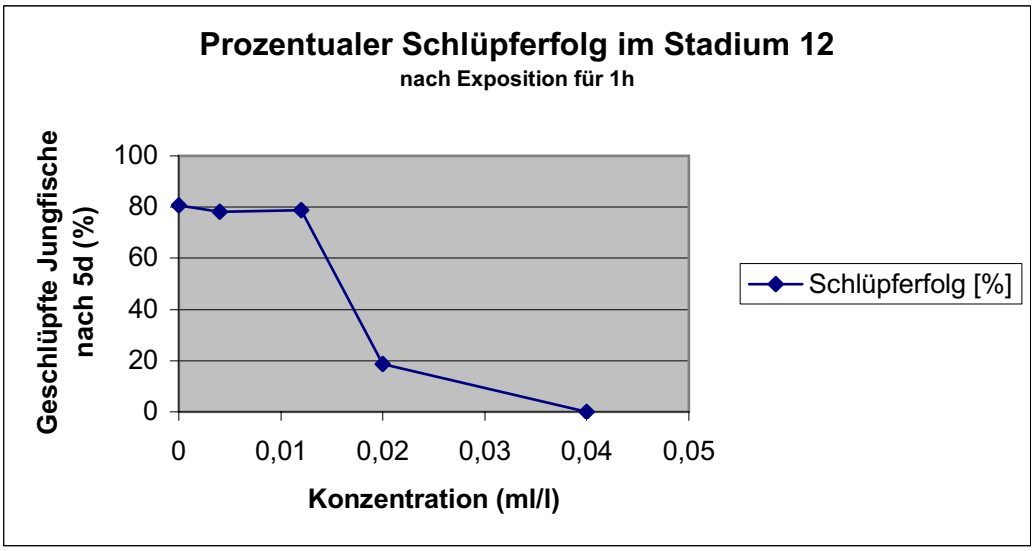


Abb.22: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition

Abb.22 macht deutlich, daß bei den zwei kleinsten Konzentrationen (0,004 und 0,012 ml/l) nur unwesentlich weniger Zebrafische nach dem fünften Versuchstag geschlüpft waren als in der Kontrollgruppe ohne Detergens, was sicherlich keinen signifikanten Unterschied darstellt.

Bei der zweithöchsten Konzentration von 0,02 ml/l schlüpften bis zum besagten Zeitpunkt weniger als 20% der Fische.

Bei der höchsten Konzentration (0,04 ml/l) waren bereits nach 24 Stunden alle Versuchstiere gestorben, wodurch die Berechnung des Schlüpferfolges hinfällig wurde.

3.1.4.2 Untersuchungen zum Prozentualen Schlüpferfolg nach 24-stündiger Exposition

Tab.31: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 nach 24-stündiger Exposition

Stadium 10 24h	Konzentration [ml/l]	Anzahl Tiere	Geschlüpfte nach 5 Tagen	Schlüpferfolg [%]
	0	96	64	66,667
	0,004	96	58	60,417
	0,008	96	67	69,792
	0,016	96	13	13,542
	0,032	96	0	0
		480		

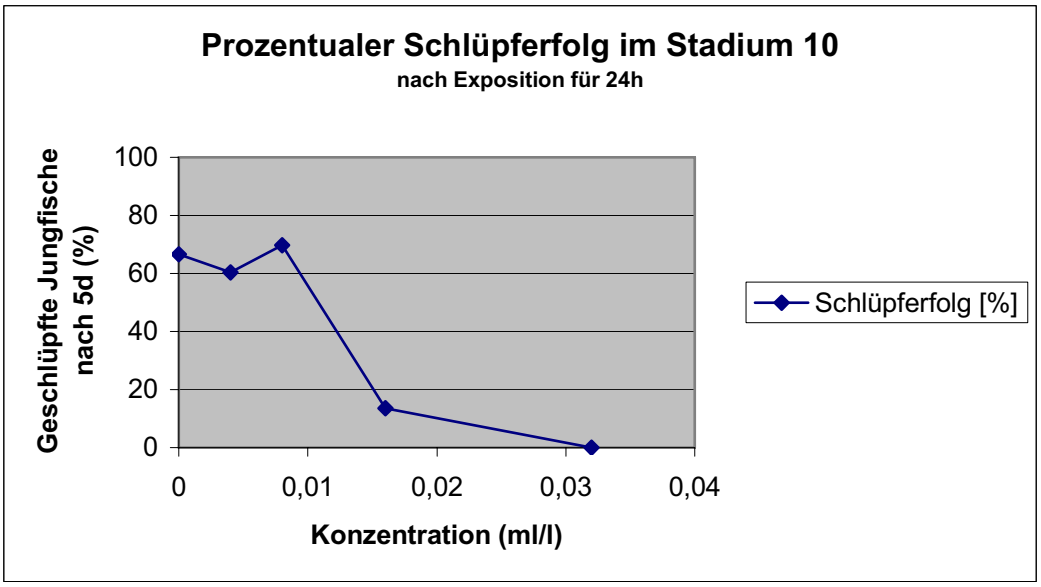


Abb.23: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 nach 24-stündiger Exposition

In Abb.23, das den prozentualen Schlüpferfolg des Entwicklungsstadiums 10 darstellt, ist der Unterschied der beiden schwächsten Konzentrationen zur Kontrollgruppe zwar etwas schwankend, jedoch allein aufgrund der Tatsache, daß bei 0,008 ml/l mehr Fische geschlüpft waren als bei 0 ml/l sicher nicht signifikant.

Die zweithöchste Konzentration von 0,016 ml/l führt dann aber zur Reduktion der Schlüpffähigkeit auf weniger als 14%. Bei der höchsten Konzentration erübrigt sich die Berechnung.

Tab.32: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 24-stündiger Exposition

Stadium 12 24h	Konzentration [ml/l]	Anzahl Tiere	Geschlüpfte nach 5 Tagen	Schlüpferfolg [%]
	0	160	118	74
	0,004	160	120	75
	0,012	160	28	18
	0,02	160	2	1
	0,04	160	0	0
		800		

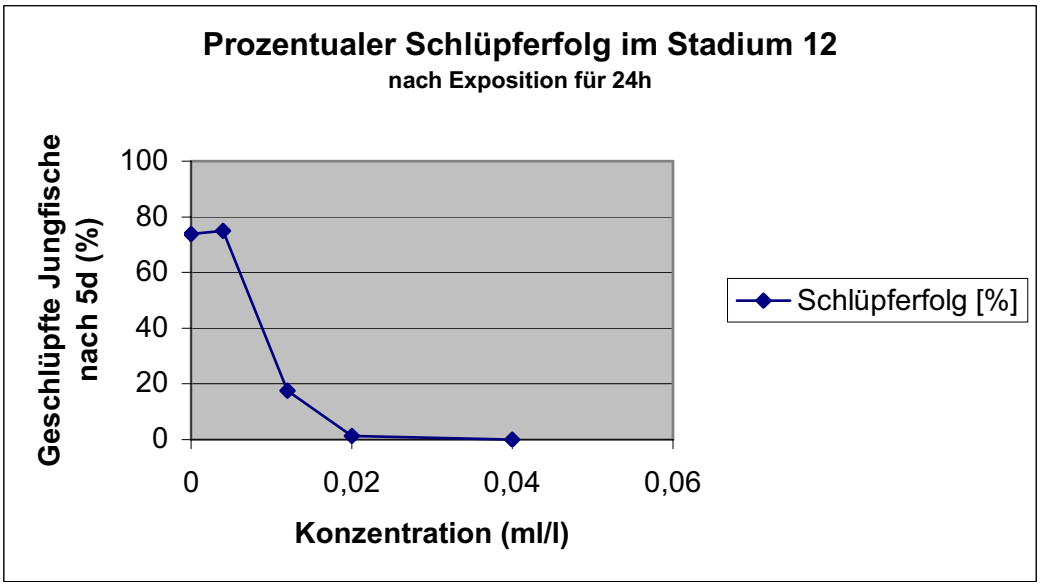


Abb.24: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 24-stündiger Exposition

Abb.24 zeigt einen uneingeschränkten Schlüpferfolg der Versuchstiere lediglich bei 0 und 0,004 ml/l. Bei der nächsthöheren Konzentration kommt es zu einem deutlichen Abfall der Kurve auf 18%.

In der Konzentrationsstufe 0,02 ml/l gelangt lediglich 1% der Versuchstiere zur Schlüpfung. Die Betrachtung der höchsten Konzentration von 0,04 ml/l war nach 24 Stunden mit dem Tod aller Zebrafische abgeschlossen.

Tab.33: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 nach 24-stündiger Exposition

Stadium 16 24h	Konzentration [ml/l]	Anzahl Tiere	Geschlüpfte nach 5 Tagen	Schlüpferfolg [%]
	0	25	25	100
	0,012	25	24	96
	0,036	25	4	16
	0,06	25	0	0
	0,12	25	0	0
		125		

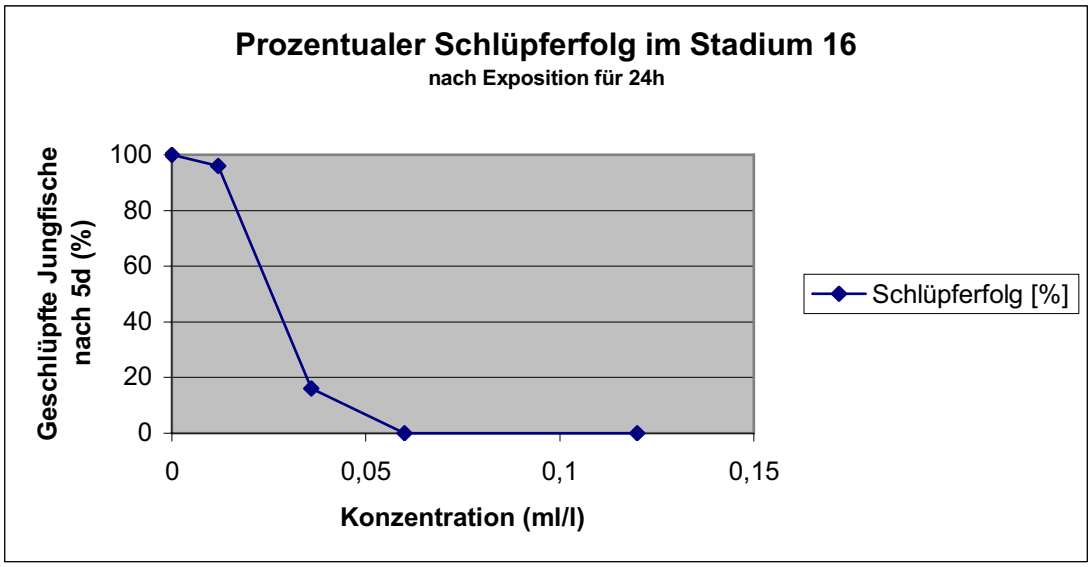


Abb.25: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 nach 24-stündiger Exposition

Die Kontrollen und die schwächste Detergenskonzentration wiesen, was in Abb.25 deutlich wird, keinen signifikanten Unterschied in Sachen prozentualer Schlüpferfolg auf. Bei der höheren Konzentration von 0,036 ml/l schlüpfen dann aber nur noch 16% der Versuchstiere, bei den zwei höchsten Konzentrationen (0,06 und 0,12 ml/l) keins mehr.

3.1.4.3 Vergleich der Prozentualen Schlüpferfolge bei verschiedenen Expositionszeiten

Tab.34: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition

Stadium 12 1h	Konzentration [ml/l]	Anzahl Tiere	Geschlüpfte nach 5 Tagen	Schlüpferfolg [%]
	0	160	129	80,625
	0,004	160	125	78,125
	0,012	160	126	78,75
	0,02	160	30	18,75
	0,04	160	0	0
		800		

Stadium 12 24h	Konzentration [ml/l]	Anzahl Tiere	Geschlüpfte nach 5 Tagen	Schlüpferfolg [%]
	0	160	118	74
	0,004	160	120	75
	0,012	160	28	18
	0,02	160	2	1
	0,04	160	0	0
		800		

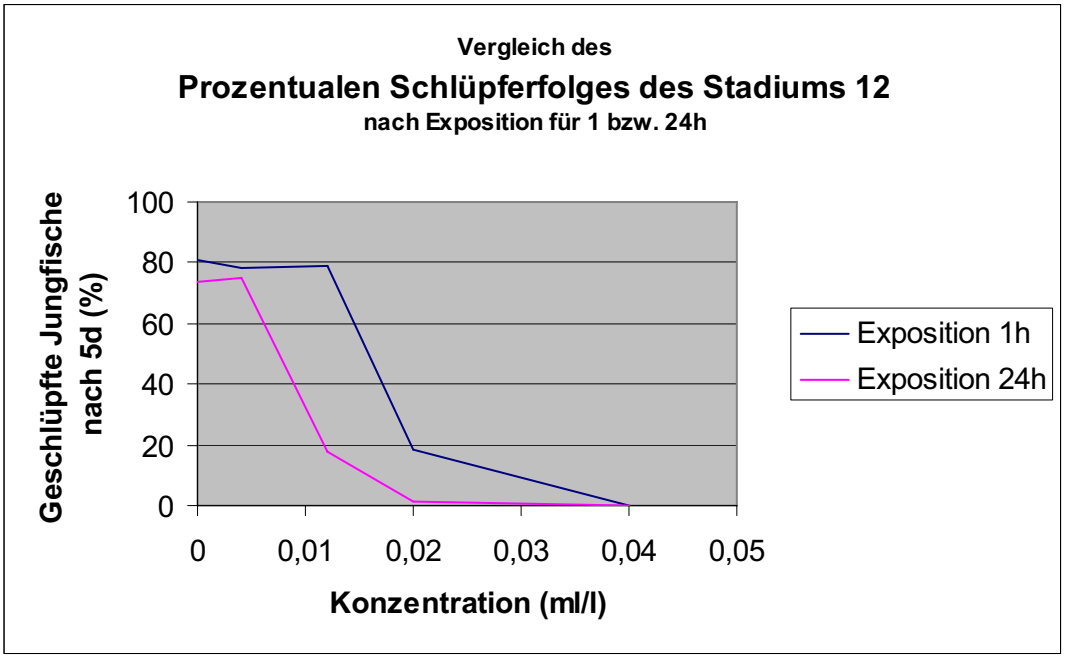


Abb.26: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition

Wie bereits der Prozentualen Sterblichkeit, wird der Einfluß des Faktors Expositionsdauer auch hinsichtlich des prozentualen Schlüpferfolges deutlich. Wie aus Abb.26 ersichtlich liegt der Anteil geschlüpfter Jungfische der 1-Stunden-Versuche im oben angesprochenen Effektbereich stets über dem der 24 Stunden exponierten Fische. Das Detergens nimmt folglich erst bei höheren Konzentrationen Einfluß auf die Schlüpffähigkeit der Zebrafische. Daher ist der Unterschied zwischen dem prozentualen Schlüpferfolg kurz exponierter Tiere und dem lange exponierter signifikant. Die Schlüpffähigkeit der Fische korreliert somit in beiden Fällen negativ mit der Expositionsdauer.

3.1.4.4 Vergleich der Prozentualen Schlüpferfolge verschiedener Entwicklungsstadien

Tab.35: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24-stündiger Exposition

Stadium 10 24h	Konzentration [ml/l]	Anzahl Tiere	Geschlüpfte nach 5 Tagen	Schlüpferfolg [%]
	0	96	64	66,667
	0,004	96	58	60,417
	0,008	96	67	69,792
	0,016	96	13	13,542
	0,032	96	0	0
		480		

Stadium 12 24h	Konzentration [ml/l]	Anzahl Tiere	Geschlüpfte nach 5 Tagen	Schlüpferfolg [%]
	0	160	118	74
	0,004	160	120	75
	0,012	160	28	18
	0,02	160	2	1
	0,04	160	0	0
		800		

Stadium 16 24h	Konzentration [ml/l]	Anzahl Tiere	Geschlüpfte nach 5 Tagen	Schlüpferfolg [%]
	0	25	25	100
	0,012	25	24	96
	0,036	25	4	16
	0,06	25	0	0
	0,12	25	0	0
		125		

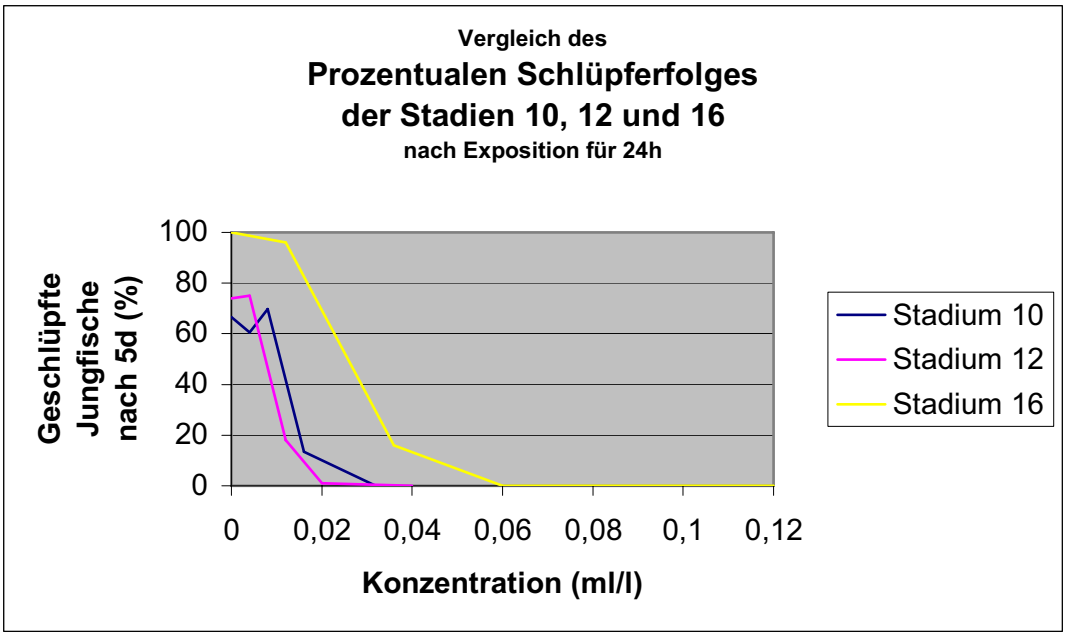


Abb.27: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24-stündiger Exposition

Der in Abb.27 graphisch dargestellte Vergleich der prozentualen Schlüpferfolge der untersuchten Entwicklungsstadien spiegelt die Verhältnisse wieder, die bereits beim Vergleich der prozentualen Mortalitäten deutlich wurden.

Die Schlüpffähigkeit der Fische im frühen und späten Blastulastadium unterscheidet sich nur unwesentlich und daher vermutlich nicht signifikant.

Der Schlüpferfolg der Fischembryonen des Entwicklungsstadiums 16, also der späten Gastrula, liegt in den entsprechenden Konzentrationsbereichen deutlich über dem der früheren Entwicklungsstadien.

Folglich unterscheidet sich der Einfluß von ARIEL auf die Schlüpffähigkeit der Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 signifikant von dem auf die Entwicklungsstadien 10 bzw. 12 und zeigt erst bei sichtbar höheren Konzentrationen die gleichen limitierenden Effekte.

3.2 Makroskopische Untersuchung von Mißbildungen

Neben dem allgemeinen toxischen Potential der Detergentiengemische ARIEL und PERWOLL sollten in den durchgeführten Embryo-Larvalversuchen spezifische Defekte untersucht werden, die durch die applizierten Noxen zustande kamen, um schließlich mit den teratogenen Wirkungen des Terpens Retinol verglichen zu werden.
Zum Vergleich mit Zebrafischen und Krallenfröschen aus Kontrollen wurden Fische aus den Detergentien-Versuchen, sowie durch Hypervitaminose A während der Embryonalentwicklung mißgebildete Frösche untersucht.
Auf anatomische Auffälligkeiten wurden die Tiere zum einen während der Embryonal- bzw. Larvalphase und zum anderen als Jungtiere, d.h. im Falle von *Brachydanio rerio* zwei Monate nach Versuchsende und im Falle von *Xenopus laevis* im Entwicklungsstadium 66, untersucht.
Besonderes Augenmerk sollte der Entstehung und Häufigkeit von Mißbildungen des Achsenskeletts gelten, um analog zum bekannten teratogenen Potential von Retinoiden grenzflächenaktive Detergentien als potentiell ursächlich für Fehlentwicklungen des Skelettes zu identifizieren.

3.2.1 Toxische Auswirkungen von Detergentien auf die Embryonal - und Larvalentwicklung von *Brachydanio rerio*

Für die Versuche mit *B.rerio*-Embryonen bei 1 bzw. 24 Stunden Exposition wurden drei unterschiedliche Embryonalstadien ausgewählt.
Das Entwicklungsstadium 10 tritt etwa 2 ½ Stunden nach der Befruchtung auf und wird als späte, hohe Blastula bezeichnet, da sich die Blastomeren am animalen Pol hoch über dem Dotter auftürmen.
Das Embryonalstadium 12 repräsentiert eine sehr späte Blastula, die etwa 5 Stunden nach der Befruchtung auftritt. Da sich viele kleine Blastomeren in den Dottersack einsenken, nimmt der Embryo im Entwicklungsstadium 12 eine Kugelform an.
Etwa 7 ¾ Stunden nach der Befruchtung befindet sich der Embryo im mittleren Gastrulastadium. Das Blastoderm hat zu diesem Zeitpunkt ¾ des Dotters umwachsen, während ein großer Dotterpfropfbereich offen bleibt. Im Embryonalschild hat sich ein deutlicher Mittelstrang erhoben. Im folgenden Entwicklungsstadium werden bereits am Kopfende die ersten Somiten erkennbar.

Nach 1 h Exposition der Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 müßten sich diese wie die Kontrollen im Stadium 11 befinden und schon eine Abflachung des Blastoderms aufweisen. In der Regel waren bei diesen Embryonen aber noch keine Veränderungen gegenüber dem Beginn der Exposition zu beobachten, was hier schon auf eine Entwicklungsverzögerung hindeutete.

24 h nach der Exposition müßten sich die Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 im Stadium 20/21 befinden und mit ca. 25 Somiten und einer Chorda aus vakuolisierten Zellen, die sich vom Gehörbläschen bis zur Schwanzspitze ausdehnt, ausgestattet sein. Ferner müßte sich zu diesem Zeitpunkt der Schwanz vom Dotter abheben und Muskelbewegungen und Otolithen erkennbar sein.

Embryonen im Entwicklungsstadium 12 müßten sich nach 1 h Exposition im Vergleich zu den Kontrollembryonen etwa im Stadium 15 befinden. Dies wäre eine mittlere Gastrula, bei der etwa die Hälfte des Dotters vom Blastoderm umwachsen ist und sich das Embryonalschild von der dorsalen Urmundlippe aus langsam erhebt.

Nach 24 h Exposition müßten sich die Embryonen gleichlaufend mit denjenigen der Kontrollen im Entwicklungsstadium 21/22 befinden. Nun wären schon die Anlagen der Bauchflossen erkennbar, und die Schwanzspitze würde den Kopf berühren. Die Anzahl der Somiten müßte 32 betragen, die Gehirnentwicklung beendet sein und der Kopf sich langsam vom Dotter lösen. Das auffälligste Merkmal in diesem Embryonalstadium des Zebrafisches ist Melaninbildung in der Retina.

Befinden sich Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 für 1 h in einer Detergentienlösung, so müßten sie am Versuchsende im Vergleich mit jenen der Kontrollen das Stadium 17/18 erreicht haben, das durch den Verschluß des Blastoporus, 2-4 Somiten und eine vollständig ausgebildete embryonale Achse mit Neuralrohr charakterisiert ist.

24 h nach der Exposition in der Detergenslösung müßten die Embryonen das Stadium 22/23 erreicht haben. Nun sind bereits Gehirnvesikel erkennbar und der dorsale Flossensaum dehnt sich über die Schwanzspitze aus und erreicht ventral den Anus. Die Pigmentierung des Körpers setzt ein, indem sternförmige Melanophoren zunächst am Kopf und auf dem Dottersack, danach in einer typisch linearen Anordnung am Rücken bis zur Schwanzspitze sichtbar werden.

Im Vergleich zu den Kontrollen wurde eine Vielzahl von Fehlbildungen beobachtet. Zunächst verlief der Entwicklungsfortschritt bis zur Gastrulation und häufig auch darüber hinaus verzögert ab, was bei Embryonen, die hohen Konzentrationen des

Detergens (≥ 0,012 ml/l im Stadium 12) ausgesetzt waren, besonders auffällig war, da diese bis zu 3 Stadien hinter jenen der Kontrollen zurückblieben.

Die Epibolie während der Gastrulation verlief so langsam, daß ein normalerweise runder Embryo nun hantelförmig wurde. Die Ursache ist darin zu sehen, daß die Innenzellen am Keimscheibenrand zurückbleiben, während die Deckzellen weiter vorwärts wandern und dadurch den Dotter am vegetativen Pol einschnüren (HINTZE-PODUFAL et al. 1985, SANDER et al. 1983). Die Innenzellen nehmen bei diesen Embryonen nun nicht mehr wie in der Normalentwicklung an der Formbildung des Keimstreifs teil, was zur Folge hat, daß die Ausbildung des Embryonalschildes und damit der Achsenorgane mitten in der Keimscheibe in unterschiedlichem Ausmaß verhindert wird.

Daraus resultieren Entwicklungsanomalien des Kopfes (Kopfdislokationen, Anencephalus, Microcephalus, Bulldoggenformen) und dessen Sinnesorganen wie der Augenanlagen (Fehlen des Pigmentes, der Linse, ein- oder beidseitige Anophthalmie, offene oder zu kleine Augenbecher etc.) und der Ohrplakode (ein- oder beidseitig fehlende Ohrbläschen oder nicht ausgebildete Otolithen bei vorhandenen Ohrbläschen).

Desweiteren traten Entwicklungsanomalien des Rumpfes (gedrungen verkürzt, verbogen), des Flossensaums (ventral und/oder dorsal an Körper oder Schwanz fehlend, kein kontinuierlicher, sondern unterbrochener Verlauf), sowie des Schwanzes auf (verkürzt, d.h. über das Schwanzknospenstadium nicht hinausgewachsen, ¼ oder ½ der normalen Schwanzlänge, oder Schwanzanlage nicht vom Dotter abgelöst).

Weitere organotropen Auswirkungen betreffen das Vorkommen, die Verteilung und das Fehlen des Pigmentes am Körper des Embryos, das Auftreten von unterschiedlich großen Ödemen zwischen dem inneren und äußeren Blatt der der Dottersackhüllen oder des Perikardraumes.

Detergentien beeinflussen die Spontanbewegung des Embryos in der Perivitellinflüssigkeit, die normalerweise nach 24 h einsetzt, was für die ausreichende O_2-Aufnahme notwendig ist. Die Spontanbewegungsrate der Embryonen nimmt mit steigender Konzentration ab und besteht dann nur noch aus einem Zucken der Schwanzspitze. Solche Embryonen sterben in der Regel ab, da ihre geringe Bewegung nicht mehr dafür ausreicht, ihre Lage ausreichend zu verändern.

Die Dottersackgefäße und die Aorta dorsalis weisen im normalentwickelten Embryo nach 32 h Blutzellen auf. Durch die Detergentien wird der Blutkreislauf beeinflußt bis

ein Blutstrom kaum noch erkennbar ist. Auch die Herzfrequenz nimmt von 119 (+/- 14) Schlägen/min bei Kontrollen auf 70 Schläge bei den Versuchstieren ab.
Die Todesursachen der Embryonen nach Detergentieneinwirkung bestanden letztlich überwiegend darin, daß die Entwicklung stark verlangsamt oder angehalten wurde. Ferner waren stark geschädigte Larven nicht in der Lage zu schlüpfen oder blieben im Chorion stecken.

3.2.2 Untersuchungen zur Häufigkeit von Mißbildungen bei *B.rerio*

Bei den Untersuchungen zur Häufigkeit von Mißbildungen beim Zebrafisch wurden Fische betrachtet, die im Entwicklungsstadium 12 für eine oder 24 Stunden veschiedenen Detergenslösungen ausgesetzt worden waren.
Bei der Bestimmung der prozentualen Mißbildungsrate wurde der Anteil mißgebildeter Zebrabärblinge an der Anzahl überlebender Fische, und nicht wie bei den vorangegangenen Berechnungen am Anteil der zu Versuchsbeginn eingesetzten Tiere bestimmt. Dabei wurden verschiedene Mißbildungsformen untersucht und gezählt, die in diesem Teil der Auswertung jedoch nur quantitative Relevanz haben.

Tab.36: Prozentuale Häufigkeit der Mißbildungen von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach ein- bzw. 24-stündiger Exposition

Stadium 12 1h	Konzentration [ml/l]	Anzahl	Tote	Überlebende	Mißgebildete	Mißgebildete [%]
	0	80	6	74	0	0
	0.004	80	3	77	2	2,60
	0.012	80	3	77	33	42,86
	0.02	80	55	25	25	100
	0.04	80	80	0	/	/
				253		

Stadium 12 24h	Konzentration [ml/l]	Anzahl	Tote	Überlebende	Mißgebildete	Mißgebildete [%]
	0	80	20	60	0	0
	0.004	80	18	62	2	3,23
	0.012	80	54	26	23	88,46
	0.02	80	78	2	2	100
	0.04	80	80	0	/	/
				150		

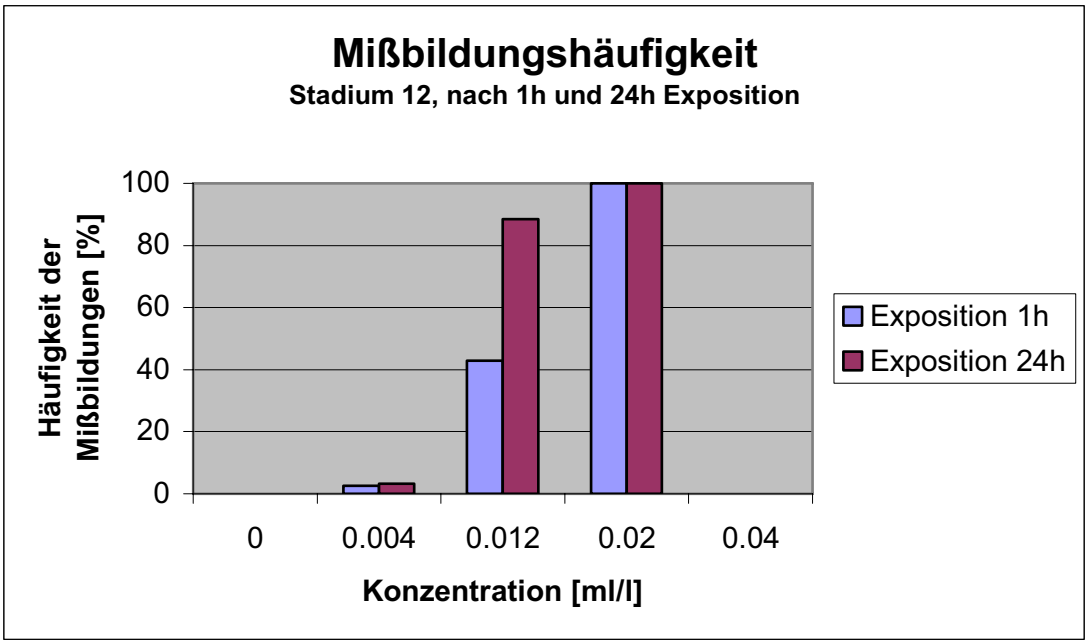


Abb.28: Prozentuale Häufigkeit von Mißbildungen des Entwicklungsstadiums 12 nach ein- bzw. 24stündiger Exposition

Bei der Betrachtung der Mißbildungshäufigkeit, wie sie in Abb.28 dargestellt ist, wird bei beiden Expositionszeiten ein geringer Unterschied zwischen den Kontrollen und der geringsten Konzentration von 0,004 ml/l ersichtlich, der jedoch vernachlässigbar klein ist.

Bei einer Konzentration von 0,012 ml/l werden die Effekte des Detergens hingegen mehr als deutlich. Im Langzeit-Versuch wiesen nahezu 90% der überlebenden Jungfische Mißbildungen auf. Bei der gleichen Konzentration kam es im 1-Stunden-Versuch immerhin zu einem Anteil defekter Fische von über 40%.

Allein durch Betrachtung dieser Konzentrationsstufe wird ersichtlich, daß die Expositionsdauer nicht nur wie beschrieben positiv mit der Mortalität der Fische, sondern auch positiv mit deren Neigung zur Ausprägung von Mißbildungen korreliert.

Die Fische der nächsthöheren Konzentration von 0,02 ml/l wiesen zu 100% mindestens eine der untersuchten Mißbildungen auf, unabhängig ob es sich um Langzeit- oder Kurzzeitexposition handelte.

Da 100% der Fische der Konzentrationsstufe 0,04 ml/l nach 24 Stunden bereits gestorben waren, wurde eine Untersuchung auf Defekte hinfällig.

3.2.3 Untersuchung verschiedener Mißbildungstypen von *B.rerio*

Bei der Untersuchung der Fischembryonen auf anatomische Auffälligkeiten wurden bestimmte Defekte ausgewählt und zu Gruppen zusammengefaßt.

Defekte der Augen sind in Tab.37 unter a (Augen) angeführt, jene der Gehörentwicklung unter b (Ohrbläschen), Mißbildungen der Körperpigmentierung unter c (Pigmentierung), ödematöse Defekte unter d (Ödeme), Defekte des Flossensaums unter e (Flossensaum) und Mißbildungen des Schwanzes unter f (Schwanz).

Unter dem Stichwort g (WS) sind Mißbildungen der Wirbelsäule des Entwicklungsstadiums 12 zusammengefaßt, die in den folgenden Kapiteln noch ausführlicher beschrieben werden.

Das Erscheinen von multiplen Mißbildungen innerhalb eines Individuums trat besonders in den höheren, subletalen Konzentrationsbereichen häufiger auf.

Tab.37: Häufigkeit verschiedener Mißbildungstypen des Entwicklungsstadiums 12 nach Exposition für 1 bzw. 24 Stunden

Exposition 1 h	**Augen**	**Ohrbläschen**	**Pigmentierung**	**Ödeme**	**Flossensaum**	**Schwanz**	**WS**
Mißbildungstyp	**a**	**b**	**c**	**d**	**e**	**f**	**g**
Anzahl von Mißbildungen	1	1	55	2	20	13	35
Häufigkeit (%)	1,67	1,67	91,67	3,33	33,33	21,67	58,33

Exposition 24 h	**Augen**	**Ohrbläschen**	**Pigmentierung**	**Ödeme**	**Flossensaum**	**Schwanz**	**WS**
Mißbildungstyp	**a**	**b**	**c**	**d**	**e**	**f**	**g**
Anzahl von Mißbildungen	1	1	26	0	10	6	17
Häufigkeit (%)	3,70	3,70	96,30	0,00	37,04	22,22	62,96

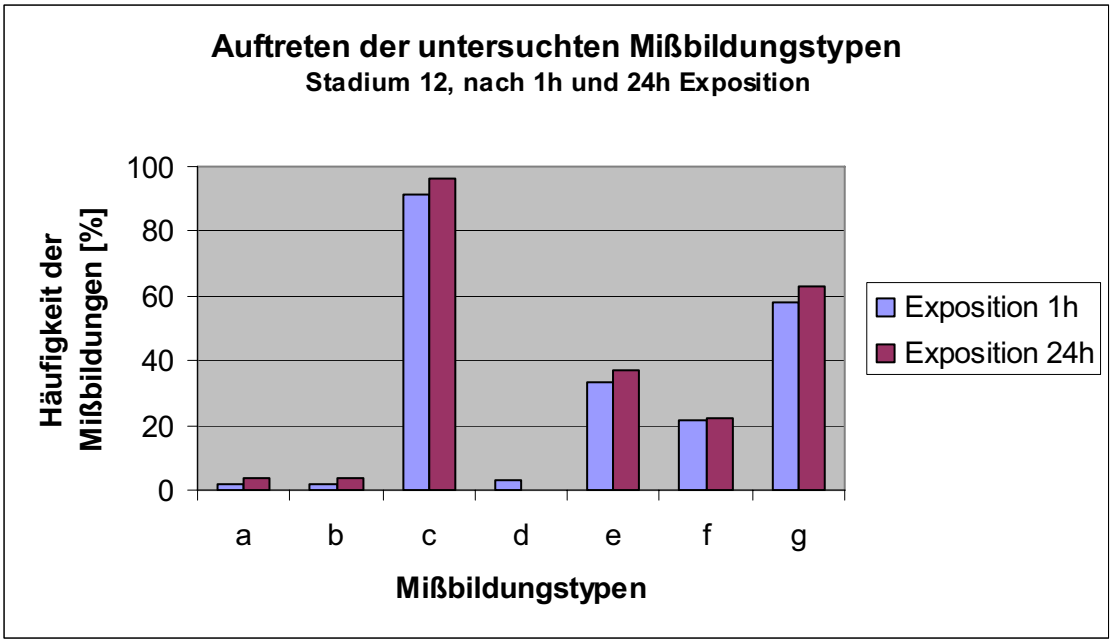


Abb.29: Häufigkeit verschiedener Mißbildungstypen im Entwicklungsstadium 12 nach Exposition für 1 bzw. 24 Stunden

In Abb.29 werden bezüglich der untersuchten Mißbildungsformen Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens deutlich.

Beim Entwicklungsstadium 12 kommt es nur in wenigen Fällen zu Defekten der Sinnesorgane, weshalb diese in den Versuchen als nicht signifikant zu bewerten sind. Das gleiche gilt für das Auftreten von Ödemen.

Häufiger treten im Entwicklungsstadium 12 Defekte des Flossensaums auf, nämlich mit einer Häufigkeit von fast 40%. Die Häufigkeit von Defekten der Pigmentierung ist im Vergleich mit allen anderen untersuchten Defekten mit über 90% am größten.

Bei der Untersuchung der Embryonen im Hinblick auf Skelettmißbildungen wurde zwischen Defekten der embryonalen Schwanzwirbelsäule und der übrigen Rumpfwirbelsäule unterschieden. Mißbildungen der Schwanzwirbelsäule traten bei Fischen des Entwicklungsstadiums 12 mit einer Häufigkeit von mehr als 20% auf, die der vorderen Rumpfwirbelsäule etwa dreimal so häufig.

Insgesamt scheint der Unterschied der Mißbildungshäufigkeit zwischen der lange und der kurz exponierten Gruppe eher gering zu sein. Man muß dabei allerdings beachten, daß Mißbildungen nur in einem sehr begrenzten Konzentrationsbereich auftreten und aufgrund der weitaus höheren Sterblichkeit im Langzeit-Versuch viel weniger Fische als im Kurzzeit-Versuch überlebten, was die Aussagekraft der Mißbildungsrate begrenzt.

3.2.4 Untersuchung von Defekten der Wirbelsäule von *B.rerio* nach Detergentienexposition

3.2.4.1 Häufigkeit verschiedener Wirbelsäulendefekte von *B.rerio*

Fische der Gattung *Brachydanio* weisen 31-32 Wirbel auf. Die Wirbelkörper der Teleostier werden als amphicoel bezeichnet, d.h. in den Höhlungen zwischen zwei Wirbeln befindet sich ein Chordarest. Innerhalb der Wirbelsäule gibt es keine großen Unterschiede im Bau der Wirbel unterschiedlicher Regionen.

Die Untersuchung der verschiedenen Mißbildungsformen der Wirbelsäule wurde an 2 Monate alten Fischen durchgeführt. Betrachtet wurden zum einen anomale Ausrichtungen bzw. Krümmungen der Wirbelsäule in die drei Raumrichtungen. Dazu gehört die Kyphose [zu griech. *kyphós* = gebückt, gekrümmt] (dorsalkonvexe Krümmung), die Lordose [zu griech. *lordós* = vorwärts gekrümmt] (ventralkonvexe Krümmung) und die Skoliose [zu griech. *skoliós* = krumm, verdreht] (Krümmung nach lateral).

Zum anderen traten Verkleinerungen der Gesamtkonstitution des Körpers der Versuchstiere auf, die als Nanosomie (Zwergwuchs) in die Gruppe der Wirbelsäulendefekte einbezogen wurden. Das Auftreten von mehreren Mißbildungen innerhalb eines Individuums kam auch hier häufiger vor.

Tab.38: Häufigkeit verschiedener Mißbildungen der Wirbelsäule im Entwicklungsstadium 12

Entw.stadium 12 Exposition 1h Konzentration 0,2 ml/l	**Mißbildungen der WS [%]**	**Nanosomie**	**Lordose**	**Kyphose**	**Skoliose**
Häufigkeit [%]	84	30,77	61,54	69,23	92,31

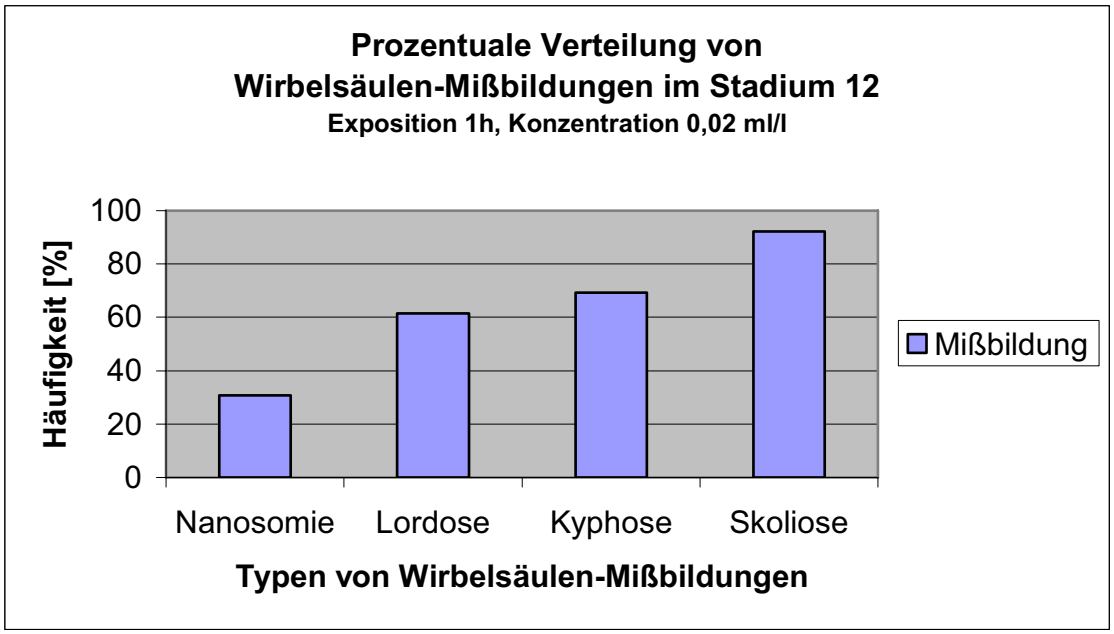


Abb.30: Prozentuale Häufigkeit verschiedener Mißbildungen der Wirbelsäule im Entwicklungsstadium 12

Von den in Abb.30 dargestellten Wirbelsäulendysplasien trat in der Gruppe der untersuchten Jungfische die Skoliose mit über 90% am häufigsten auf.

Lordosen und Kyphosen der Wirbelsäule traten mit 62% bzw. 69% etwa gleich häufig in Erscheinung. Die Nanosomie war im Vergleich mit den genannten Krümmungsdefekten etwas seltener repräsentiert und kam nur bei etwa 31% der untersuchten Individuen vor.

3.2.4.2 Untersuchungen von Mißbildungen des Achsenskeletts von *B.rerio*

Die in diesem Teil der Arbeit beschriebenen Mißbildungen des Achsenskeletts umfassen die Wirbelsäulenverkrümmungen Kyphose, Lordose und Skoliose, sowie die Nanosomie. Die drei erstgenannten Verkrümmungen können alle Abschnitte der Wirbelsäule betreffen. Beispiele für unterschiedliche Lokalisation beim Zebrafisch werden in den folgenden Abbildungen gezeigt. Meist treten Wirbelsäulenverkrümmungen mit anderen Mißbildungen zusammen auf, z.B. mit Deformationen des Schädels oder Veränderungen der Flossen. Hierbei spielt der Faktor Expositionsdauer eine entscheidende Rolle.

3.2.4.2.1 Nanosomie

Abb.31: Lateralansicht eines normalentwickelten Zebrabärblings aus einer Kontrollgruppe ohne Detergentienexposition während der Embryonal- und Larvalentwicklung

Abb.32: Lateralansicht eines Zebrafisches mit Nanosomie nach1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

Zebrabärblinge mit Nanosomie (vgl.Abb.32, 33, 34, 39) weisen eine im Vergleich mit normalentwickelten Fischen (vgl.Abb.31, 36) verringerte Gesamtkörpergröße auf. Dabei können Tiere trotz minderer Körperlänge über eine normale Anzahl an Wirbeln verfügen. Bei anderen Exemplaren mit ebenfalls verkürztem Körper trägt hauptsächlich ein verkürzter Schwanzbereich zum Erscheinungsbild des Zwergwuchses bei. Bei diesen Tieren ist die Wirbelanzahl je nach Grad der Verkürzung verringert.

Abb.33: Lateralansicht eines Zebrafisches mit Nanosomie und Kyphose der LWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

Abb.34: Lateralansicht eines Fisches mit Nanosomie und Lordose der HWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

3.2.4.2.2 Kyphose

Abb.35: Lateralansicht eines Zebrafisches mit Kyphose der LWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

Bei Zebrabärblingen mit Kyphose der Wirbelsäule zeigt die Körperachse eine dorsalkonvexe Krümmung, die über den normalen Schwankungsbereich hinausgeht. Die Krümmung kann alle Abschnitte der Wirbelsäule betreffen und von sehr unterschiedlicher Ausdehnung sein. Beispiele für verschiedene Lokalisationen einer Kyphose beim Zebrafisch werden in den Abb.35, 37, 39, 40, 46 und 47 gezeigt.

Je nach Grad einer Kyphose sind auch die Rippen von der Veränderung der skelettalen Verhältnisse betroffen. Abb.36 zeigt einen normalentwickelten Zebrabärbling, bei dem die nach kaudal kürzer werdenden Rippen sich ventralwärts verjüngen und in der Seitenansicht den Körper des Fisches im Brust- und Bauchbereich fast vollständig umgreifen. Darüberhinaus bilden die distalen Enden der parallel angeordneten Rippen im normalentwickelten Fisch mit Ausnahme einer kleinen Einziehung im Bereich des Afters eine Linie mit den Ansatzstellen der Flossenstrahlen, also mit der Basis der Afterflosse.

Im Brust- oder Bauchwirbelsäulenbereich kyphotisch geschädigte Fische, wie der in Abb.37 gezeigte, haben im Vergleich mit normalentwickelten Fischen verkürzte und insgesamt derber gebaute Rippen, die sich ventralwärts nicht verjüngen und nach kaudal nicht kürzer werden. Entsprechend der Wirbelsäulenverkrümmung weisen kyphotisch defekte Fische eine s-förmig deformierte Linie von Rippenenden und Lepidotrichiabasis auf. Lediglich die parallele Anordnung der Rippen bleibt im defekten Fisch erhalten. Ihr stumpfer und verkürzter Bau und ihre in der Sagittalebene gegeneinander versetzte Anordnung haben zur Folge, daß die Rippen ihre Aufgabe, die Brust- und Bauchorgane zu umfassen, im Bereich des Defektes nicht mehr in vollem Umfang ausüben können. Folglich verbleibt bei betroffenen Zebrafischen wie dem in den Abb.37 und 38 ein Teil der Brust- bzw. Bauchorgane außerhalb des knöchernen Rippengerüsts.

Bei kyphotischen Tieren werden im Bereich eines Defektes der Wirbelsäule neben Veränderungen der Rippen auch Lageveränderungen der Wirbelstrukturen deutlich. Die Basiventralia aufeinanderfolgender Wirbel nähern sich im Defektbereich einander an, was zu einer Verkleinerung der ebenfalls knöchernen Interventralia führt.

Die Verbiegung der Wirbelsäule kann sich zudem auf die Lage der Rückenflosse in Form einer Verschiebung nach rostrad oder kaudad auswirken.

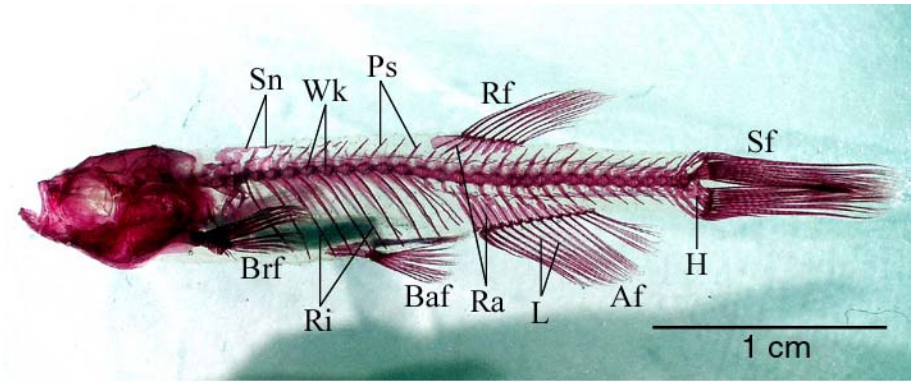


Abb.36: Alizarinfärbung eines normalentwickelten Zebrabärblings aus einer Kontrollgruppe ohne Detergensexposition, Lateralansicht.
Af Afterflosse, **Baf** Bauchflosse, **Brf** Brustflosse, **H** Hypuralia, **L** Lepidotricha, **Ps** Processus spinosi, **Ra** Radien, **Rf** Rückenflosse, **Ri** Rippen, **Sf** Schwanzflosse, **Sn** Supraneuralia, **Wk** Wirbelkörper

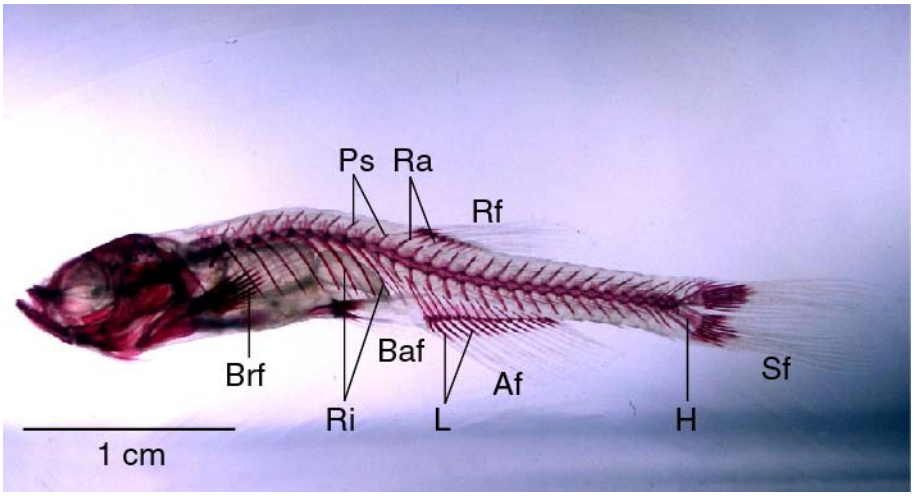


Abb.37: Alizarinfärbung eines Zebrabärblings mit Kyphose der BWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12, Lateralansicht.
Af Afterflosse, **Baf** Bauchflosse, **Brf** Brustflosse, **H** Hypuralia, **L** Lepidotricha, **Ps** Processus spinosi, **Ra** Radien, **Rf** Rückenflosse, **Ri** Rippen, **Sf** Schwanzflosse

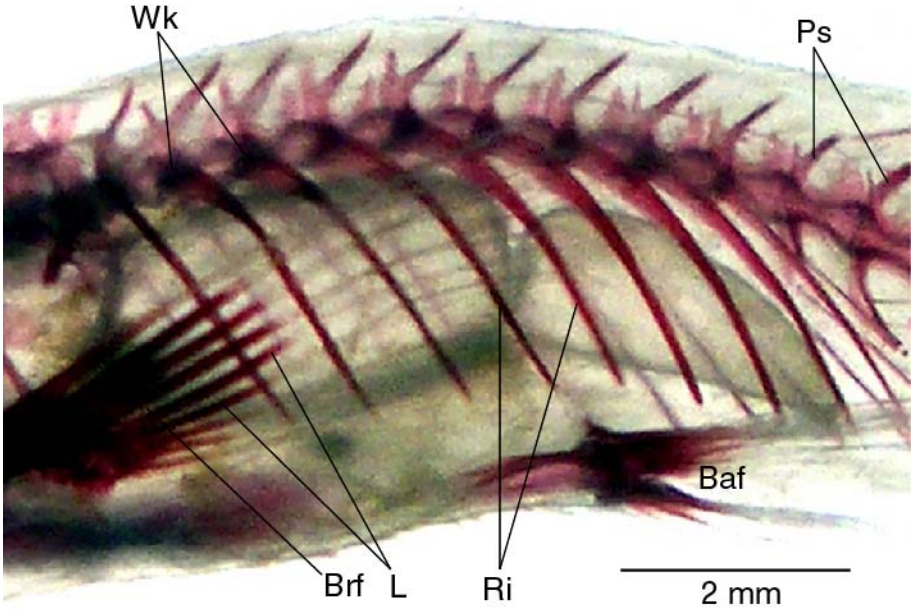


Abb.38: Ausschnitt der kyphotischen BWS-Region, Lateralansicht.
Baf Bauchflosse, **Brf** Brustflosse, **L** Lepidotricha, **Ps** Processus spinosi, **Ri** Rippen, **Wk** Wirbelkörper

Abb.39: Lateralansicht eines Zebrafisches mit Nanosomie, deformiertem Schädel, Kyphose der BWS und Lordose der HWS und SWS nach 24stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

Abb.40: Lateralansicht eines Fisches mit Kyphose der LWS und Lordose der HWS nach 24stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

3.2.4.2.3 Lordose

Abb.41: Lateralansicht eines Fisches mit Lordose der HWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

Bei Tieren mit Lordose der Wirbelsäule zeigt die Körperachse eine ventralkonvexe Krümmung. Auch diese kann an unterschiedlichen Stellen der Wirbelsäule lokalisiert sein.

Die Zebrabärblinge in den Abb.42 und 44 weisen eine Lordose im Bereich der Lenden- und Schwanzwirbelsäule auf. Auch im Falle einer solchen Wirbelsäulenverkrümmung

ist bei Zebrafischen die erwähnte Linie der Rippenenden und des Übergangs von den Radien der Afterflosse zu den knöchernen Lepidotrichiabasen verändert. Die im normalentwickelten Fisch kleine Einziehung im Afterbereich ist im defekten Tier deutlich vergrößert, wodurch ein Teil der Bauchorgane nach außerhalb des Rippengerüsts verlagert wird. Die Rippen sind nur geringfügig verkürzt und verjüngen sich kaudalwärts entsprechend den Verhältnissen im normalentwickelten Fisch. Die Parallelität der Rippen geht kaudal aber verloren (vgl.Abb. 42 und 44). Die letzten beiden Rippen geraten durch die nach dorsal gebogene Schwanzwirbelsäule in einen spitzen Winkel zur Wirbelsäule, so daß ihre distalen Enden in die Nähe der kranialen Radien, die im normalentwickelten Fisch parallel zu den Rippen angeordnet sind, verlagert werden.

Bei lordotisch veränderten Zebrafischen wie in den Abb.42 und 44 finden sich im Defektbereich im Vergleich mit kyphotisch defekten Tieren umgekehrte Verhältnisse in Bezug auf die Wirbel. Durch die ventralkonvexe Biegung der Körperachse kommt es zu einer Annäherung der Basidorsalia, wodurch im Lordosebereich die Interdorsalia kleiner werden. Auch bei diesen Tieren kann aus der Wirbelsäulenverkrümmung eine nach rostrad oder kaudad versetzte Lage der Rückenflosse resultieren.

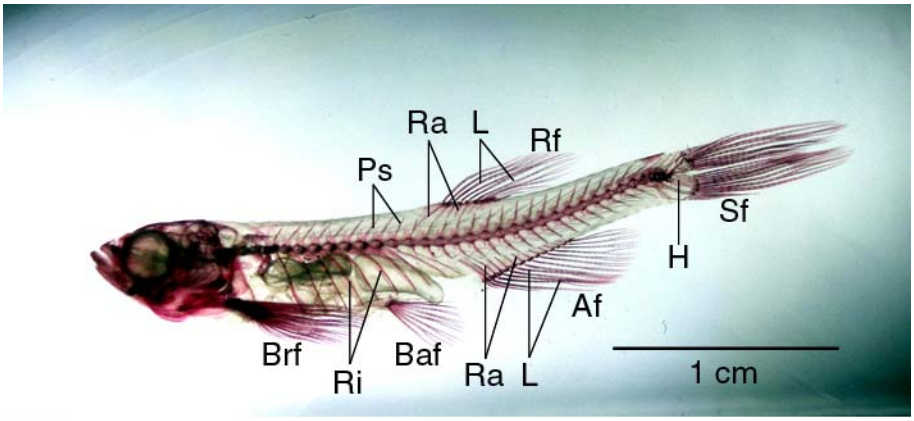


Abb.42: Alizarinfärbung eines Zebrabärblings mit Lordose der LWS/SWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12, Lateralansicht. **Af** Afterflosse, **Baf** Bauchflosse, **Brf** Brustflosse, **H** Hypuralia, **L** Lepidotricha, **Ps** Processus spinosi, **Ra** Radien, **Rf** Rückenflosse, **Ri** Rippen, **Sf** Schwanzflosse

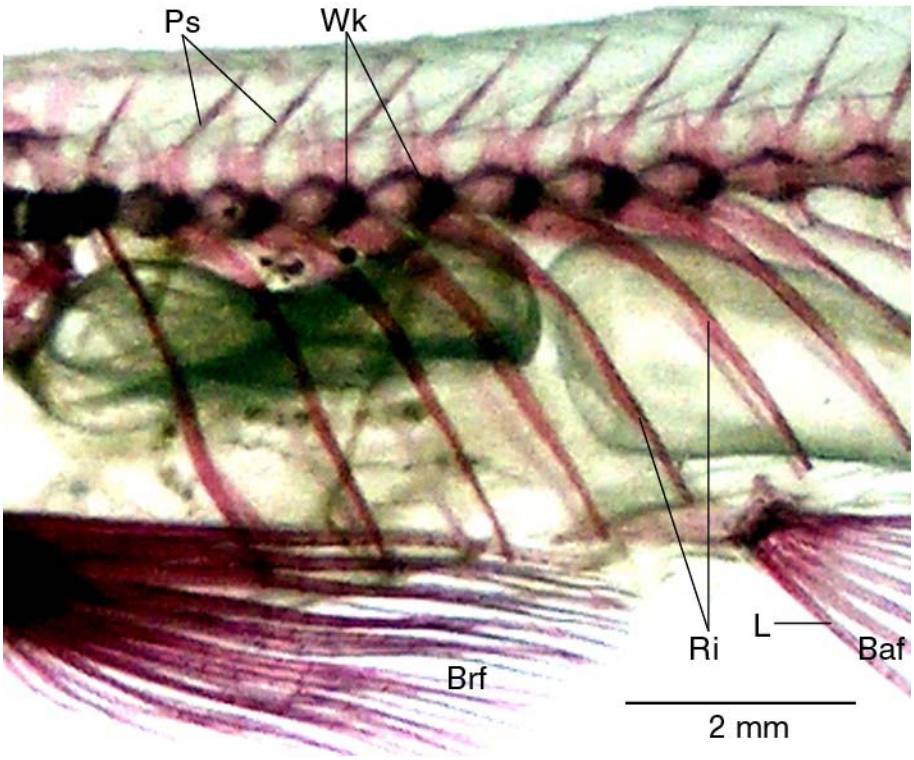


Abb.43: Ausschnitt der lordotischen BWS/LWS-Region, Lateralansicht.
Brf Brustflosse, **L** Lepidotricha, **Ps** Processus spinosi, **Ri** Rippen, **Wk** Wirbelkörper

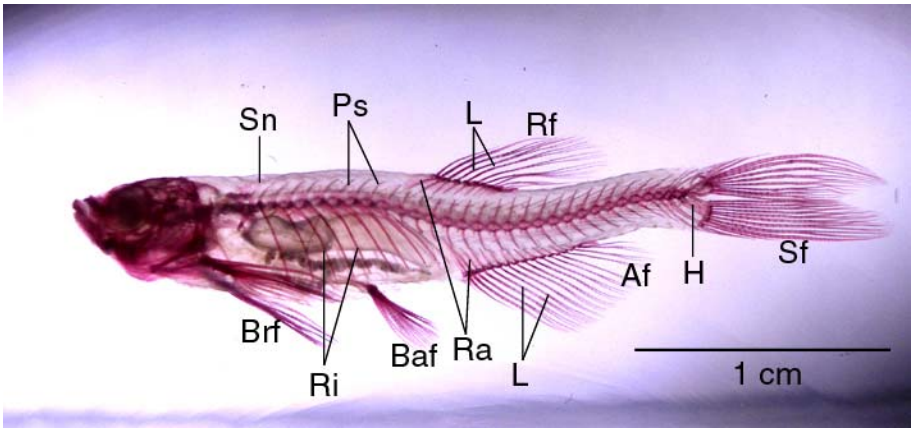


Abb.44: Alizarinfärbung eines Zebrabärblings mit leichter Lordose der LWS/SWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12, Lateralansicht. **Af** Afterflosse, **Baf** Bauchflosse, **Brf** Brustflosse, **H** Hypuralia, **L** Lepidotricha, **Ps** Processus spinosus, **Ra** Radien, **Rf** Rückenflosse, **Ri** Rippen, **Sf** Schwanzflosse, **Sn** Supraneuralia, **Wk** Wirbelkörper

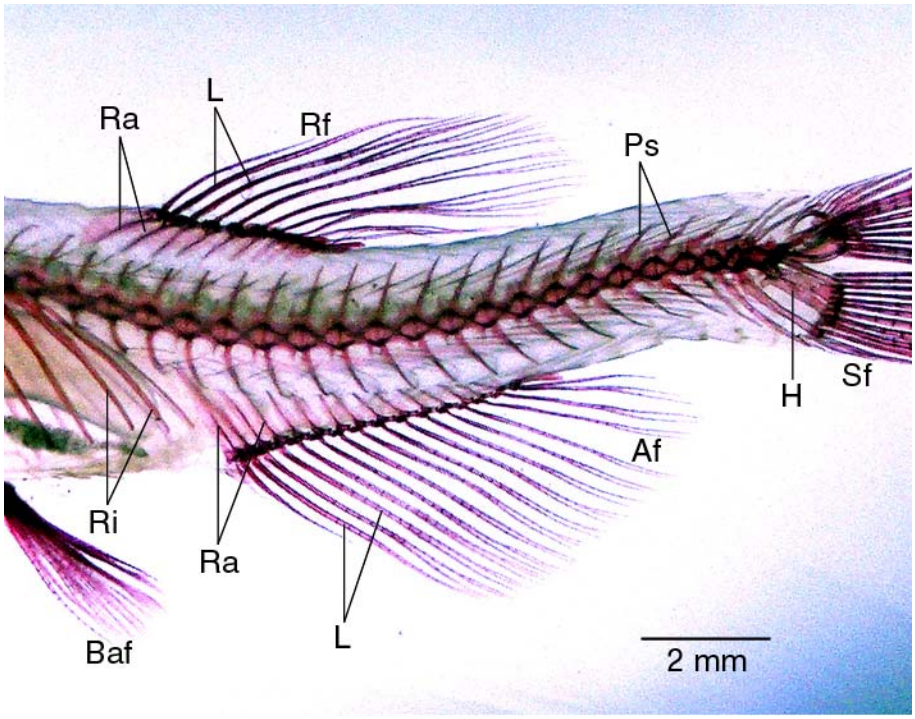


Abb.45: Ausschnitt der lordotischen BWS/LWS-Region, Lateralansicht.
Af Afterflosse, **Baf** Bauchflosse, **H** Hypuralia, **L** Lepidotricha, **Ps** Processus spinosus, **Ra** Radien, **Rf** Rückenflosse, **Ri** Rippen, **Sf** Schwanzflosse

Abb.46: Zebrabärbling mit deutlicher Lordose der SWS und Kyphose der LWS nach 24stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

Abb.47: Zebrabärbling mit deformiertem Schädel, Lordose der HWS/BWS und Kyphose der BWS nach 24stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

3.2.4.2.4 Skoliose

Abb.48: Dorsalansicht eines Zebrabärblings mit Skoliose der SWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

Abb.49: Dorsalansicht eines Zebrafisches mit Skoliose der SWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

Im Bereich eines skoliotischen Defektes der Schwanzwirbelsäule konnte es wie beim Fisch in Abb.51 zu einer Verdickung des Schwanzendes kommen. Kurz vor dem Defekt waren die Wirbelkörper verkürzt. Im verdickten Defektbereich zeigte die Wirbelsäule häufig mehrfache Krümmungen und zum Teil einen s-förmigen Verlauf.
Bei skoliotisch veränderten Fischen fiel häufig eine ausgleichende, sozusagen der Verbiegung entgegengesetzte Haltung der Schwanzwirbelsäule kaudal des Defektes auf. Da vermutlich schon durch eine diskrete Skoliose der Wirbelsäule die Schwimmeigenschaften der Tiere massiv beeinträchtigt sind, dienen diese „paradoxen“ Skoliosen möglicherweise als Ausgleichshaltung und somit der Minimierung einer Wirbelsäulenkrümmung (vgl. Abb.48-50).

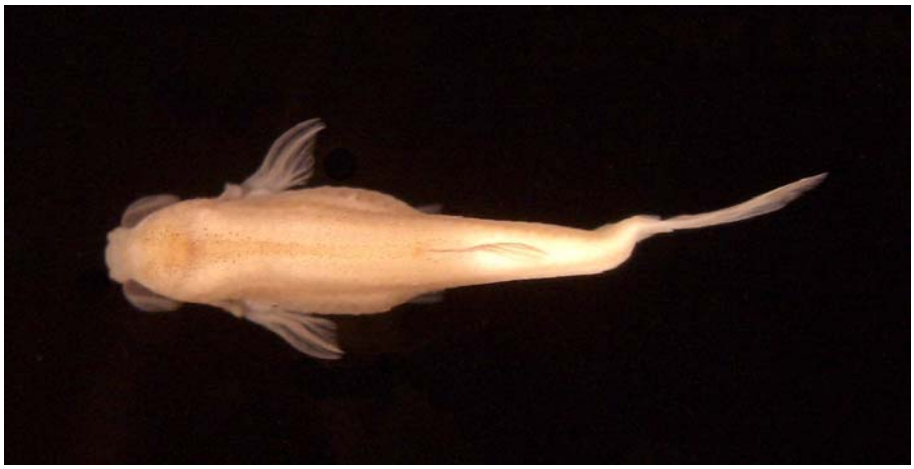


Abb.50: Dorsalansicht eines Fisches mit Skoliose der SWS nach 1stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

Abb.51: Dorsalansicht eines Zebrabärblings mit Skoliose der LWS und deformierter SWS nach 24stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12

3.2.5 Toxische Auswirkungen von Retinol auf die Embryonal - und Larvalentwicklung von *X.laevis*

Eine konzentrations- und zeitabhängige Applikation von Retinol zeigte in den Versuchen zu dieser Arbeit einen deutlichen Einfluß auf die Embryonalentwicklung von *X.laevis*. In Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Exposition traten nach Retinolkontakt mannigfaltige Defekte während der Fortentwicklung der Tiere auf.

In den Versuchen wurde deutlich, daß die Empfindlichkeit der Embryonen und Larven gegenüber Retinol bei fortschreitender Entwicklung abnimmt.

Bei den sich schnell entwickelnden Embryonen der frühen Stadien 14 bis 23 war eine Entwicklungsverzögerung besonders deutlich zu beobachten, da diese während des Versuchs mehrere Entwicklungsstadien durchlaufen. Bei Larven des Stadiums 42 war dieser Effekt weniger deutlich, beim Stadium 53 erst bei Expositionszeiten über 48h erkennbar, da nach dieser Zeit auch bei normaler Entwicklung erst das nächste Entwicklungsstadium erreicht wird.

Bei den Neurulastadien 14 bis 18 von *X.laevis* traten nach Retinol-Exposition häufig Microcephalie und Augenanomalien auf. Bei langen Expositionszeiten von 48 und 96 Stunden kamen viele andere Mißbildungen hinzu.

Abweichungen der Pigmentierung, die im Stadium 53 nicht mehr in Erscheinung traten, waren bei Versuchen mit den frühen Stadien 14 bis 18 sehr viel häufiger als bei jenen mit Versuchstieren der fortgeschrittenen Stadien 23 bis 53.

Die Froschlarven, die sich zum Zeitpunkt der Retinol-Applikation in einem der späteren Entwicklungsstadien 23 bis 53 befanden, waren typischerweise von einer Wachstumsretardation betroffen. Mundanomalien waren bei Larven der späteren Entwicklungsstadien ebenfalls häufig, im Stadium 42 sogar die häufigste Mißbildungsform. Auch bei Larven des Stadiums 53 traten Mundanomalien noch häufig auf. Fehlbildungen in Form eines zu schmalen und/oder unterbrochenen Flossensaums betrafen ebenfalls vor allem Versuchstiere, die zu Beginn in den späteren Stadien 42 und 53 waren.

Ödeme kamen nur bei den Stadien 14 bis 42 vor, nicht aber im Larvalstadium 53. Auch fehlen in den späteren Stadien 42 und 53 Augenmißbildungen in Form zu kleiner oder ovaler Augen, die bei Embryonen des Entwicklungsstadiums 23 nur nach langer Expositionsdauer auftraten.

3.2.6 Untersuchung von Defekten der Wirbelsäule von *X.laevis* nach Retinolexposition

Die Versuche mit Retinol verschiedener Konzentrationen bestätigten, daß das Vitamin neben zahlreichen nicht-skelettalen Defekten während der Embryogenese von *Xenopus* bevorzugt zu Fehlbildungen des Skelettes führt. Diese konnten in Form von Fehlstellungen des Achsenskeletts als Lordosen, Kyphosen oder Skoliosen, sowie als Nanosomie, also im Sinne eines Zwergwuchses des gesamten Tieres, auftreten. Darüberhinaus kam es zu häufigen Defekten der Extremitätengürtel, der Gliedmaßen und auch des Kopfes.

Abb.52: Dorsalansicht eines normalentwickelten Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 aus Kontrollen ohne Retinolexposition

Neben normalentwickelten Krallenfröschen aus Kontrollen (vgl.Abb.52) wurden die Achsenskelette von Fröschen mit Verkrümmungen des Rückgrats und Dysmelien der Gliedmaßen untersucht.

Eine Fehlstellung der Wirbelsäule im Sinne einer Lordose, Kyphose oder Skoliose, trat in den Retinolversuchen meist zusammen mit einer Mißbildung oder gar einer Aplasie

der Extremitätengürtel auf. Aplastische Schulter- bzw. Beckengürtel bedeuteten gleichzeitig Veränderungen der an ihnen inserierenden Gliedmaßen, die immer mit mehr oder weniger ausgeprägten Funktionseinbußen einhergingen (vgl.Abb 53-63).
Wirbelsäulenverkrümmungen traten prozentual bei Embryonen der frühen Stadien 14 bis 18 weitaus häufiger auf als bei jenen Versuchstieren, die zum Zeitpunkt der Applikation in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien 23 bis 53 waren.
Nanosomie, also ein Minderwuchs der Larven, trat in allen Entwicklungsstadien, häufiger aber bei den frühen Larvalstadien 14 bis 18 auf. Am häufigsten waren Frösche mit Nanosomie nach Applikation des Retinols im Larvalstadium 14. Auch wirkte sich die Dauer der Exposition beim Vergleich von 24- und 96stündigem Retinolkontakt deutlich fördernd auf das Auftreten nanosomischer Larven aus (vgl.Abb.53).

Abb.53: Dorsalansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit Nanosomie und einseitiger Amelie der Vordergliedmaßen nach 96stündiger Exposition mit Retinol der Konzentration 5 g/l im Entwicklungsstadium 42

Abb.54: Lateralansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit deformierten Extremitätengürteln nach 48stündiger Exposition mit Retinol der Konzentration 5 g/l

Abb.55: Lateralansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit deformiertem Extremitätengürteln nach 48stündiger Exposition mit Retinol der Konzentration 5 g/l

Abb.56: Dorsalansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit Deformation des Beckengürtels und Skoliose der Wirbelsäule nach 48stündiger Exposition mit Retinol der Konzentration 5 g/l

Bei den dysmelischen Krallenfröschen handelte es sich um Frösche, deren Gliedmaßen entweder funktionslos waren oder in Form einer Amelie ein- bzw. beidseitig vollständig fehlten. Eine Retinolexposition führte zu unterschiedlichen Dysmelietypen der Vorderextremitäten, darunter Tiere mit beidseitig funktionslosen Armen (vgl. Abb.60), Tiere mit einseitig funktionsloser und kontralateral fehlender Extremität (vgl. Abb.62), sowie Tiere mit kompletter Amelie der Vordergliedmaßen (vgl. Abb.57 und 58).

Bei einer Amelie der vorderen Gliedmaßen waren keine Skelettelemente des Schultergürtels ausgebildet. Im Vergleich mit normalentwickelten Krallenfröschen zeigten amelische Krallenfrösche durch Verlagerung innerer Organe häufig ein verbreitertes Abdomen. War nur eine Körperseite mit einer funktionslosen Extremität ausgestattet, waren auf der gleichen Seite auch Elemente des Schultergürtels zu finden.

Funktionslose Arme konnten von den Tieren nicht bewegt werden und lagen in der Regel vor der Brust dem Körper an. Die Bewegungslosigkeit resultierte aus einer hypoplastischen Extremitätenmuskulatur, veränderten oder verwachsenen Gelenken oder einer fehlenden Insertion der Gliedmaßen am häufig nur in Resten vorhandenen Extremitätengürtel.

Abb.57: Dorsalansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit Vorderextremitätenamelie nach Exposition mit Retinol der Konzentration 5 g/l im Entwicklungsstadium 42

Abb.58: Alizarinfärbung eines Krallenfrosches mit beidseitiger Amelie der Vorderextremitäten und multiplen Wirbeldeformationen nach Exposition mit Retinol der Konzentration 5 g/l im Entwicklungsstadium 42, Dorsalansicht

Abb.59: Detailansicht der Wirbelsäule

Abb.60: Alizarinfärbung eines *X.laevis* mit beidseitig funktionslosen Armen und multiplen Wirbeldeformationen nach Exposition mit Retinol der Konzentration 5 g/l im Entwicklungsstadium 42, Dorsalansicht

Abb.61: Detailansicht der Wirbelsäule

Abb.62: Alizarinfärbung eines Krallenfrosches mit einseitiger Amelie der Vorderextremitäten und multiplen Wirbeldeformationen nach Exposition mit Retinol der Konzentration 5 g/l im Entwicklungsstadium 42, Dorsalansicht

Abb.63: Detailansicht der Wirbelsäule

3.2.6 Untersuchung von Wirbeldefekten bei *X.laevis* nach Retinolexposition

In diesem Teil der Arbeit galt es Erkenntnisse darüber zu gewinnen, inwiefern sich eine Retinolexposition während der Embryogenese auf die Ausgestaltung der Wirbelkörper und ihre benachbarten Strukturen auswirkt.

Im Vergleich mit normalen Kontrolltieren ohne Applikation von Retinol während der Larvalentwicklung wurden retinolexponierte Jungfrösche mit und ohne makroskopisch erkennbare Wirbelsäulendefekte betrachtet. Durch die Untersuchung retinolexponierter Krallenfrösche, die sich hinsichtlich ihres Achsenskeletts unauffällig darstellten, sollten Aussagen darüber gemacht werden, welche Deformationen innerhalb der Wirbelsäule bzw. einzelner Wirbel von den betroffenen Tieren möglicherweise toleriert werden, so daß sie makroskopisch nicht zu einer Verkrümmung der Wirbelsäule führen.

Darüberhinaus wurden dysmelische Krallenfrösche auf Wirbelfehlbildungen hin untersucht, die möglicherweise im Verbund mit einem mißgebildeten oder fehlenden Extremitätengürtel zu finden sind.

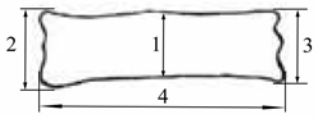
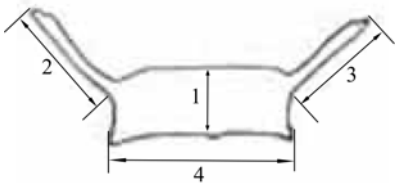
Untersucht wurden Jungfrösche des Entwicklungsstadiums 66 nach NIEUWKOOP & FABER (1975), deren Skelette nach Mazeration des Weichgewebes mit der Alizarinmethode gefärbt wurden, um eine mechanische Präparation und die damit verbundene Gefahr von Artefakten zu minimieren.

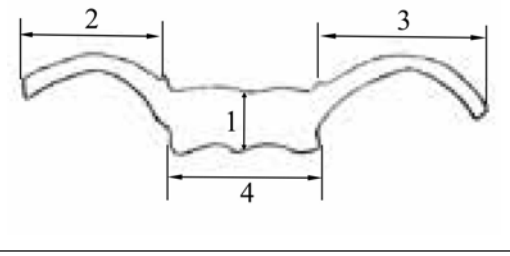
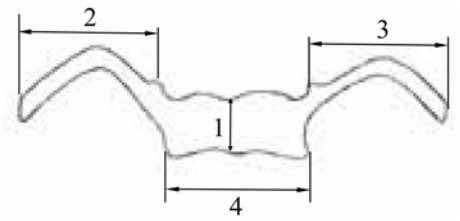
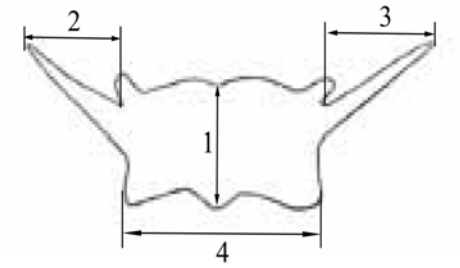
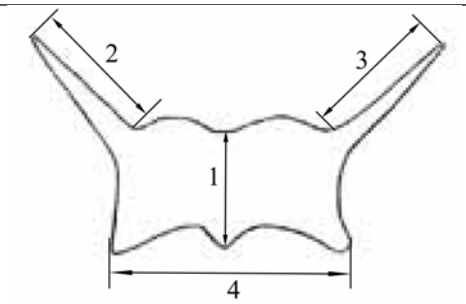
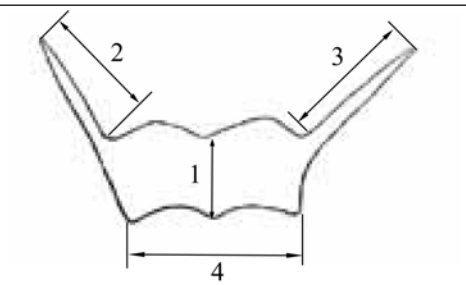
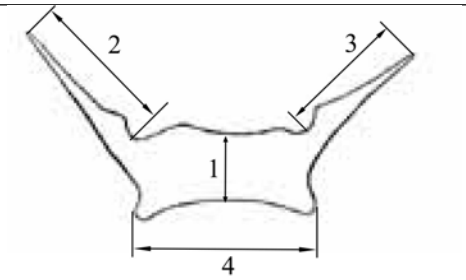
Die Frösche der Familie Pipidae, zu der die Gattung *Xenopus* gezählt wird, besitzen 5 bis 9 dorsal eingebuchtete (opisthocoele) Wirbel. Bei den Larven sind die Rippen noch frei und verschmelzen nach der Umwandlung mit den Querfortsätzen, den *Processus transversi*, der Wirbel.

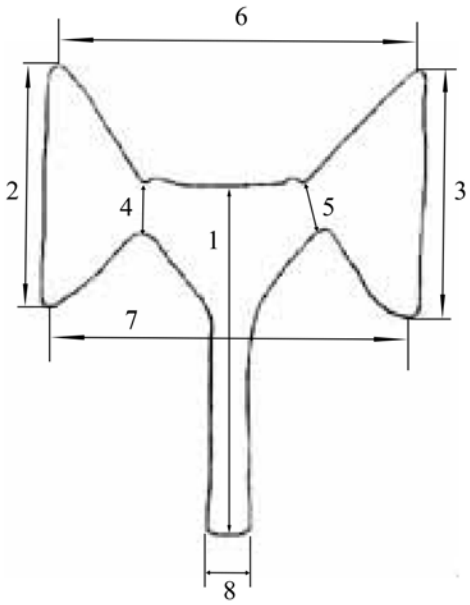
Untersucht wurden Veränderungen der Wirbelkörper des Halswirbels (*Vertebra cervicalis*) (W I in Tab.39), der drei Brustwirbel (*Vertebrae thoracicae*) (W II, III, IV in Tab.39), der vier Lendenwirbel (*Vertebrae lumbales*) (W V, VI, VII, VIII in Tab.39), des Kreuzbeins (*Os sacrum*, ursprüngliche Sakralwirbel) und des mit ihm knöchern verwachsenen Steißbeins (*Os coccygis*) bzw. ihrer Wirbelfortsätze, der *Procc. transversi*, sowie im Falle des *Os sacrum* der *Alae ossis sacri* (nach außen vorspringende Flügel des Kreuzbeins) und des *Os coccygis* (Urostyl, ursprüngliche Steißbeinwirbel) (zusammen W IX in Tab.39).

Außerdem wurden die einzelnen Wirbel in Beziehung zu ihren benachbarten Wirbeln gesetzt, um Aussagen über Veränderungen der Wirbelkörper (z.B. Spaltbildungen), der Zwischenwirbelbereiche oder Verschmelzungen von Wirbeln oder Wirbelteilen machen zu können.

Tab.39: Erläuterungen und Schemazeichnungen zu den gemessenen Wirbelabschnitten

Nr.	**Schemata der einzelnen Wirbel**	**gemessener Wirbelabschnitt**
W I 1		Höhe des W I medial
W I 2		Höhe des W I links
W I 3		Höhe des W I rechts
W I 4		Breite des W I kaudal
II 1		Höhe des W II medial
II 2		Länge des linken *Proc. transversus* des W II
II 3		Länge des linken *Proc. transversus* des W II
II 4		Breite des W II kaudal
III 1		Höhe des W III medial
III 2		Länge des linken *Proc. transversus* des W III
III 3		Länge des linken *Proc. transversus* des W III

III 4		Breite des W III kaudal
IV 1		Höhe des W IV medial
IV 2		Länge des linken *Proc. transversus* des W IV
IV 3		Länge des linken *Proc. transversus* des W IV
IV 4		Breite des W IV kaudal
V 1		Höhe des W V medial
V 2		Länge des linken *Proc. transversus* des W V
V 3		Länge des linken *Proc. transversus* des W V
V 4		Breite des W V kaudal
VI 1		Höhe des W VI medial
VI 2		Länge des linken *Proc. transversus* des W VI
VI 3		Länge des linken *Proc. transversus* des W VI
VI 4		Breite des W VI kaudal
VII 1		Höhe des W VII medial
VII 2		Länge des linken *Proc. transversus* des W VII
VII 3		Länge des linken *Proc. transversus* des W VII
VII 4		Breite des W VII kaudal
VIII 1		Höhe des W VIII medial
VIII 2		Länge des linken *Proc. transversus* des W VIII
VIII 3		Länge des linken *Proc. transversus* des W VIII
VIII 4		Breite des W VIII kaudal
IX 1		Länge des *Os sacrum* vom kranialen Rand bis zum kaudalen Rand des *Os coccygis*

IX 2		Länge der linken *Ala ossis sacri*
IX 3		Länge der rechten *Ala ossis sacri*
IX 4		Höhe des Übergangs vom Wirbelkörper des W IX zur linken *Ala ossis sacri*
IX 5		Höhe des Übergangs vom Wirbelkörper des W IX zur rechten *Alae ossis sacri*
IX 6		Abstand der kranialen Enden der *Alae ossis sacri*
IX 7		Abstand der kaudalen Enden der *Alae ossis sacri*
IX 8		Breite des kaudalen Endes des *Os coccygis*

Tab.40: Häufigkeit von Fehlbildungen einzelner Wirbel und Wirbelabschnitte normalentwickelter Krallenfrösche des Larvalstadiums 66 aus Kontrollen ohne Retinolexposition

Wirbel	Abschnitt *	Frösche mit abnormem Wirbelabschnitt	Frösche mit abnormem Wirbelabschnitt [%]	Frösche mit abnormem Wirbel	Frösche mit abnormem Wirbel [%]
I	1	0	0,00		
	2	0	0,00		
	3	0	0,00		
	4	0	0,00	0	0,00
II	1	1	7,69		
	2	1	7,69		
	3	2	15,38		
	4	0	0,00	3	23,08
III	1	1	7,69		
	2	0	0,00		
	3	2	15,38		
	4	0	0,00	3	23,08
IV	1	0	0,00		
	2	0	0,00		
	3	0	0,00		
	4	0	0,00	0	0,00

V	1	0	0,00		
	2	1	7,69		
	3	0	0,00		
	4	0	0,00	1	7,69
VI	1	1	7,69		
	2	0	0,00		
	3	0	0,00		
	4	0	0,00	1	7,69
VII	1	0	0,00		
	2	0	0,00		
	3	0	0,00		
	4	0	0,00	0	0,00
VIII	1	2	15,38		
	2	0	0,00		
	3	0	0,00		
	4	0	0,00	2	15,38
IX	1	0	0,00		
	2	0	0,00		
	3	0	0,00		
	4	4	30,77		
	5	4	30,77		
	6	0	0,00		
	7	1	7,69		
	8	0	0,00	6	46,15

* siehe Schemata in Tab.39

Tab.40 stellt die Häufigkeit von abnormen Abweichungen der Wirbelgestalt der einzelnen Wirbel einer nicht-retinolexponierten Kontrollgruppe von *Xenopus*-Larven dar. In der untersuchten Gruppe makroskopisch normalentwickelter Frösche waren anatomische Auffälligkeiten in statistisch nicht signifikanter Häufigkeit in allen Wirbeln zu finden.

In den Untersuchungen waren an den Wirbeln I, IV und VII keine Zeichen von Mißbildungen festzustellen. Die übrigen Wirbel zeigten anatomische Abweichungen in nicht signifikanter Häufigkeit und an sehr verschiedenen Stellen der Wirbelkörper. Die rippentragenden Wirbel II und III zeigten eine teilweise abnorme Erscheinung in etwa 23%iger Häufigkeit. Lediglich Wirbel IX wies mit über 46% eine noch höhere Zahl an Normabweichungen auf, die sich aber ebenso wenig auf die Struktur des gesamten

Achsenskeletts auswirkten wie die der übrigen Skelettelemente. Für die lebenden Krallenfrösche blieben diese Wirbelabweichungen jedenfalls ohne erkennbare Folgen.
Bei mehreren Krallenfröschen fanden sich einseitig Sporne am lateralen Übergang von *Os sacrum* zum *Os coccygis* (vgl. Wirbel IX in Abb.65 und 66). Ebenfalls häufiger, in etwa 31 % der Fälle, bestand eine Normabweichung der *Alae ossis sacri*. Diese konnten in der Frontalebene gegeneinander verschoben sein oder eine beim Seitenvergleich asymmetrische Dicke ihrer Basen zum *Os sacrum* aufweisen.
Spaltbildungen einzelner Wirbel wie beim Krallenfrosch-Skelett in Abb.64 traten bei nicht-exponierten Krallenfröschen selten auf. Wenn doch, waren die gespaltenen Wirbelteile meist mit den angrenzenden Wirbeln synostotisch verwachsen (vgl. Abb.64 am Beispiel des Wirbels II).

Abb.64: Alizarinfärbung der vorderen Wirbelsäule eines Krallenfrosches mit diagonaler Spaltbildung des W II und konsekutiver Verwachsung der Wirbelhälften mit den Nachbarwirbeln, Dorsalansicht

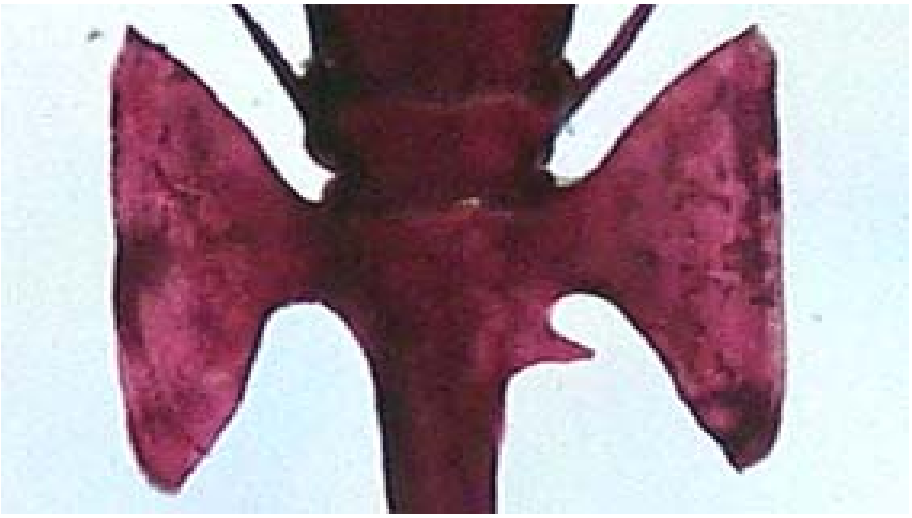


Abb. 65: Alizarinfärbung der Kreuzbeinregion eines *X.laevis* mit Knochensporn an der Basis des Urostyls, Dorsalansicht

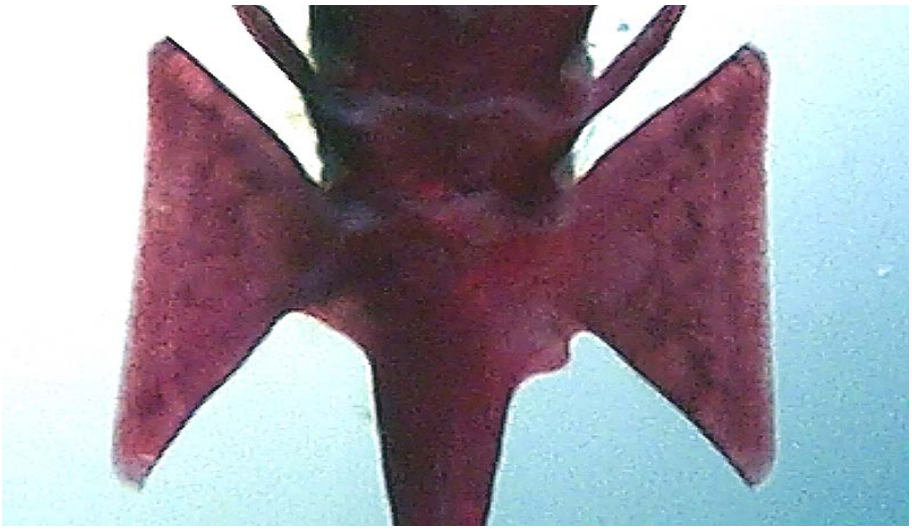


Abb.66: Alizarinfärbung des Sakralwirbels eines *X.laevis* mit Knochensporn an der Basis des Urostyls, Dorsalansicht

Dysmelische Tiere zeigten zusätzlich zur Hypoplasie bzw. zum Fehlen der vorderen Extremitäten in allen drei Fällen massive Fehlbildungen der Wirbel.

In fast 100 % der untersuchten Tiere waren Spaltbildungen einzelner Wirbelkörper zu finden. Diese führten wie in Abb.63 an Wirbel VI dargestellt ist, häufig zu einer vollständigen Teilung des Wirbels, bevorzugt in der Medianebene.

Auch Spaltbildungen, die zu einer asymmetrischen Teilung eines Wirbels führten, waren häufig zu beobachten, wie am Wirbel V des Tieres in Abb.63 zu sehen ist. In diesem Fall ist der kleinere Wirbelanteil in Form eines Schaltwirbels keilförmig zwischen den Nachbarwirbeln gelagert.

Spaltbildungen können auch innerhalb eines Wirbels verbleiben, ohne den Zwischenwirbelbereich zu beeinflussen. Eine solche Fehlentwicklung ist in Abb.61 im Wirbel I zu sehen.

Bei den untersuchten dysmelischen Mißbildungstypen waren Verwachsungen von benachbarten Wirbeln häufig. Diese konnten medial, wie am Beispiel der Wirbel I und II in Abb.59, oder lateral lokalisiert sein. Auch beidseitige Verwachsungen der lateralen Bereiche zweier benachbarter Wirbel waren zu finden. Dies verdeutlicht Abb.63, in der die Wirbel I und II des Frosches lateral verschmolzen sind. In diesem Fall verbleibt der unter normalen Umständen bewegliche Zwischenwirbelbereich als unbeweglicher Spalt. Darüberhinaus waren häufig vollständige Verwachsungen zweier Wirbel zu einem durchgehenden Blockwirbel zu finden. Diese Verschmelzung ohne resultierende Spaltbildung hat den Verlust des gesamten Wirbelsynchondrosegewebes zwischen den betroffenen Wirbeln zur Folge.

Sofern es nicht zur Verschmelzung von Wirbelanteilen kam, waren die Zwischenwirbelbereiche aller dysmelischen Tiere in nahezu 100% mitunter deutlich vergrößert. Die Stärke der Wirbelkörper war in allen Fällen signifikant geringer als bei gesunden Tieren.

Die *Procc. transversi* waren zumeist asymmetrisch und allenfalls in Resten angelegt, in deren Nähe teilweise auch Reste der Schultergürtelknochen zu finden waren (vgl. Abb.59, 61 und 63).

3.3 Cytologische Untersuchungen

Für die cytologischen Untersuchungen wurden *Xenopus*-Larven des Entwicklungsstadiums 43 nach NIEUWKOOP und FABER (1975), sowie 3 Tage alte *Brachydanio*-Larven verwendet. Die Zebrafischlarven waren zuvor im Entwicklungsstadium 12 für die Dauer von einer Stunde einer ARIEL-Lösung von 0,2 ml/l ausgesetzt worden, da diese Konstellation in den teratologischen Versuchen die höchste Mißbildungsrate bezogen auf Veränderungen der Wirbelsäule gezeigt hatte.
Die Krallenfrösche waren aus dem gleichen Grund im Entwicklungsstadium 14 für 24 bzw. 48 Stunden einer 0,2 g/l konzentrierten Retinol-Lösung ausgesetzt worden.
In den Abbildungen sind Azanfärbungen normalentwickelter Zebrabärblinge und Krallenfrösche, sowie mißgebildeter Exemplare jeweils in Total- und Detailansicht dargestellt. Dabei wurde der Fokus auf die Chorda- und Neuralrohrregion mit umgebenden Somiten gerichtet.
In den Schnittpräparaten waren Unterschiede hinsichtlich des Neuralrohrs normalentwickelter und mißgebildeter Tiere zu erkennen. Bei mißgebildeten Fröschen (vgl. Abb.69 und 70) war das Neuralrohr deutlich asymmetrisch gebaut, was in den Querschnittpräparaten deutlich wird. Die Zellen waren diffuser angeordnet als es bei normalentwickelten Fröschen (vgl. Abb.67 und 68) der Fall war.
Das Größenverhältnis von Neuralrohr zur ventral gelegenen Chorda dorsalis war bei exponierten Krallenfroschlarven deutlich zugunsten der Chorda verschoben.
Auch das Neurocoel retinolexponierter Froschlarven wies im Gegensatz zu dem von Kontrolltieren ein in Relation zum Durchmesser des Neuralrohrs vergrößertes Lumen auf. Insgesamt erschienen Neuralrohr, Chorda und Somitenmuskulatur in ihrer Lage zueinander bei Larven mit Noxenkontakt im Seitenvergleich stets asymmetrischer als bei Kontrolltieren.
Die Chorda dorsalis defekter Froschlarven (vgl. Abb.69, 73 und 84) war häufig hypertrophiert, was sich auch auf den Bereich der Hypochorda erstreckte.
Darüberhinaus wies sie bei exponierten Frosch- und Fischlarven im Gegensatz zu der von Kontrolltieren meist undifferenzierte Bindegewebszellen auf(vgl. Abb.69, 76 und 84), wo sich unter normalen Bedingungen im histologischen Bild nur die dünnen Wände der turgeszenten Chordazellen hervortun (vgl.Abb. 67, 71, 74 und 80).

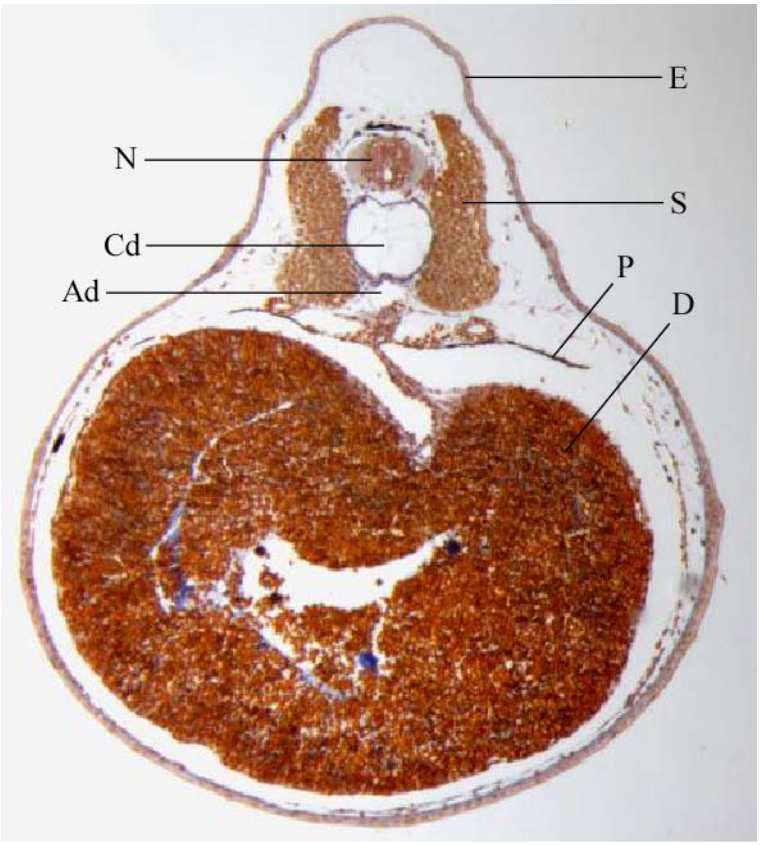


Abb.67: Querschnitt durch eine normalentwickelte *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43. **Ad** Aorta dorsalis, **Cd** Chorda dorsalis, **D** Darm, **E** Epidermis, **N** Neuralrohr, **P** Peritoneum, **S** Somit

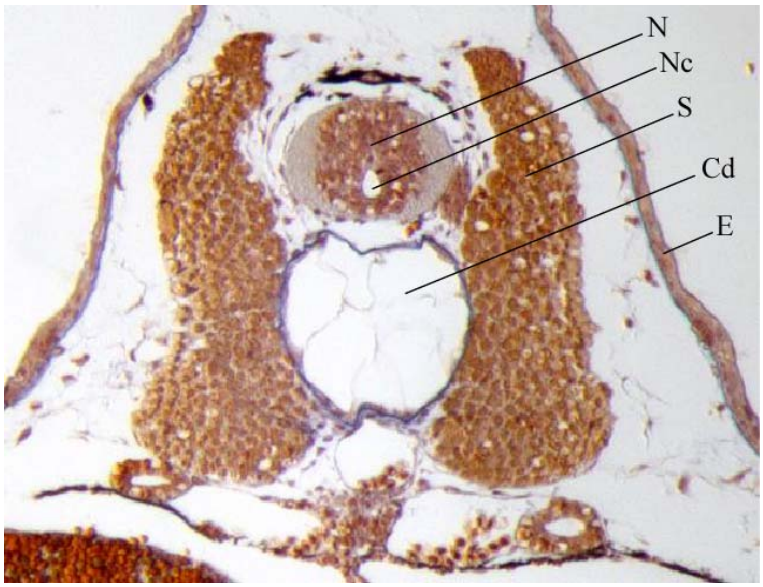


Abb.68: Detailansicht des Chorda- und Neuralrohrbereichs. **Cd** Chorda dorsalis, **E** Epidermis, **N** Neuralrohr, **Nc** Neurocoel, **S** Somit

Abb.69: Querschnitt durch eine mißgebildete *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43 nach 24stündiger Exposition mit Retinol der Konzentration 0,2 g/l im Larvalstadium 14. **Ad** Aorta dorsalis, **Cd** Chorda dorsalis, **D** Darm, **E** Epidermis, **N** Neuralrohr, **Nc** Neurocoel, **P** Peritoneum, **S** Somit

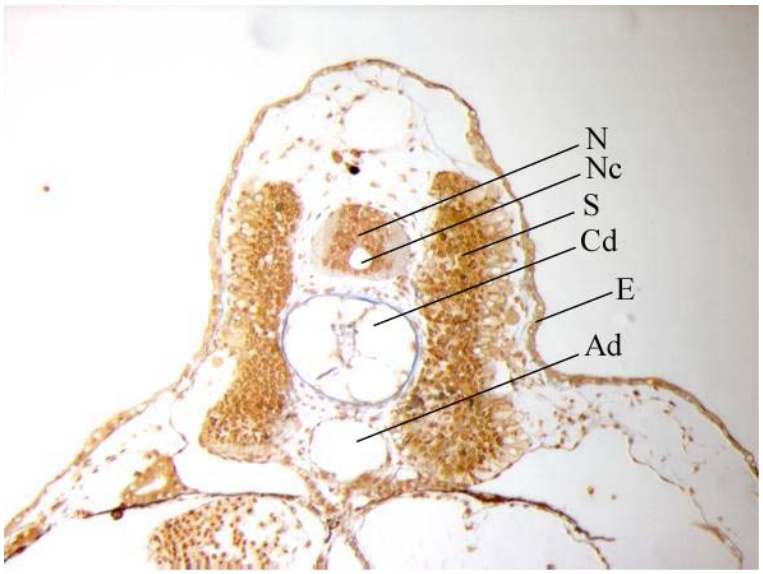


Abb.70: Detailansicht des Chorda- und Neuralrohrbereichs. **Ad** Aorta dorsalis, **Cd** Chorda dorsalis, **E** Epidermis, **N** Neuralrohr, **Nc** Neurocoel, **S** Somit

Bei mißgebildeten Frosch- und Fischlarven schienen die Somitengrenzen teilweise aufgelöst (vgl. Abb.73, 76, 79 und 84) zu sein und zeigten tiefere Einziehungen (vgl. Abb.76 und 82) als im gesunden Tier. Die Somitenmuskulatur intakter Frösche und Fische erschien wesentlich regelmäßiger und kompakter (vgl. Abb.71 und 74).
Im Seitenvergleich waren die Somiten mißgebildeter Krallenfrösche und Zebrafische häufig unterschiedlich dick und somit asymmetrisch (vgl. Abb.69, 76, 79 und 82)).
Die Faserdichte innerhalb der Somitenmuskulatur defekter Frösche und Fische war gegenüber normalentwickelten deutlich herabgesetzt. Bereiche zwischen den im Vergleich mit intakter Somitenmuskulatur locker angeordneten Muskelfasern erschienen durch nicht ausdifferenzierte Zellen fibrosiert.
Ödeme (vgl. Abb.76 und 82) erwiesen sich in den teratologischen Versuchen mit Retinol und Detergentien als unspezifisches Mißbildungsmerkmal, von dem Frosch- und Fischlarven in allen frühen Entwicklungsstadien in unterschiedlichem Maße oder auch gar nicht betroffen waren.

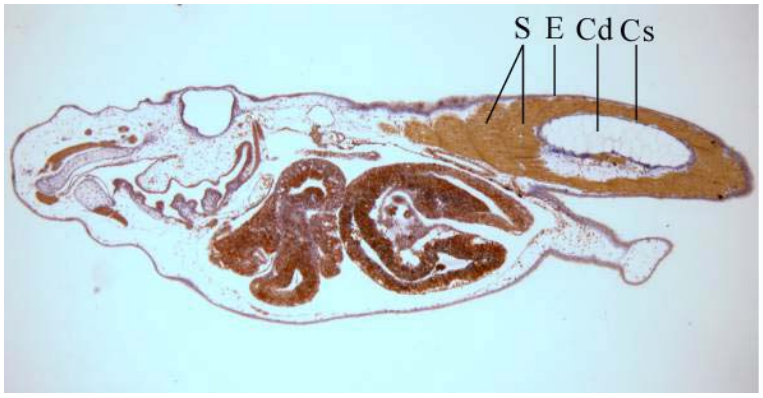


Abb.71: Sagittalschnitt einer normalentwickelten *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43.**Cd** Chorda dorsalis, **Cs** Chordascheide, **E** Epidermis, **S** Somiten

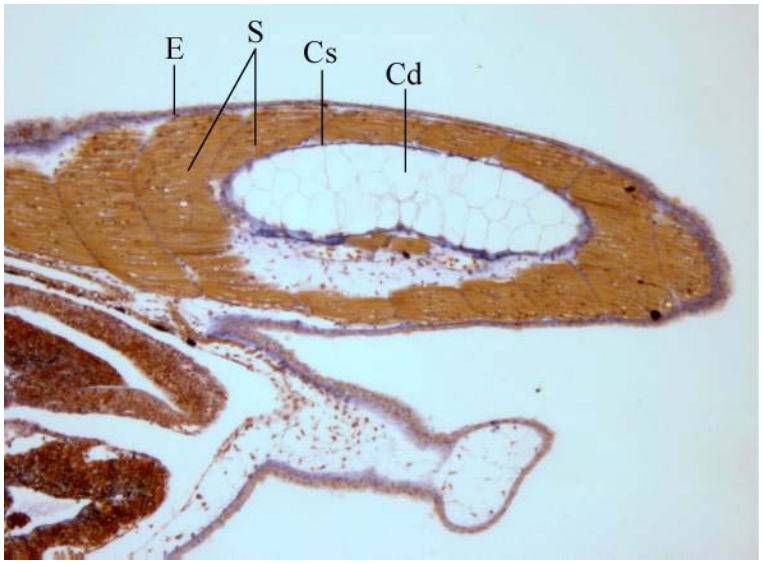


Abb.72: Detailansicht des Chordabereichs. **Cd** Chorda dorsalis, **Cs** Chordascheide, **E** Epidermis, **S** Somiten

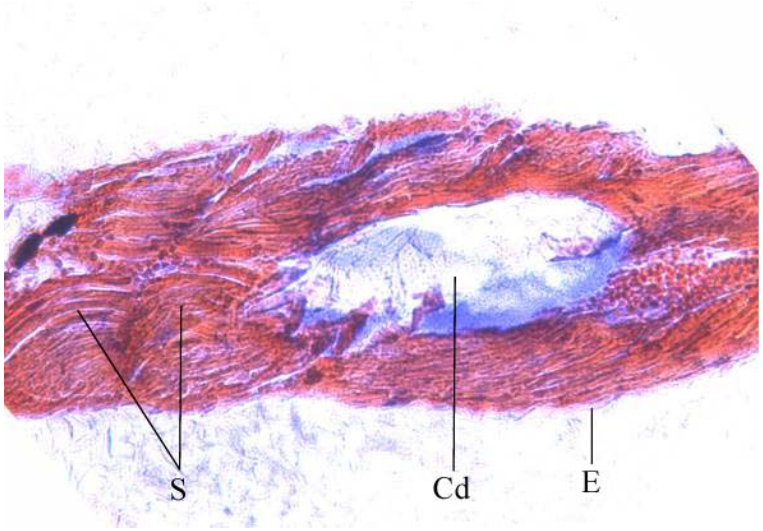


Abb.73: Sagittalschnitt einer mißgebildeten, 3 Tage alten *Brachydanio*-Larve nach 24stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12. **Cd** Chorda dorsalis, **E** Epidermis, **S** Somiten

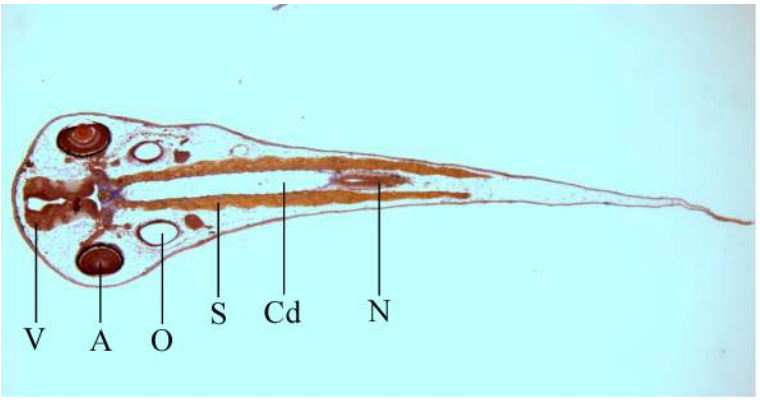


Abb.74: Frontalschnitt durch eine normalentwickelte *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43. **A** Augenbecher, **Cd** Chorda dorsalis, **N** Neuralrohr, **O** Ohrvesikel, **S** Somit, **V** Vorderhirn

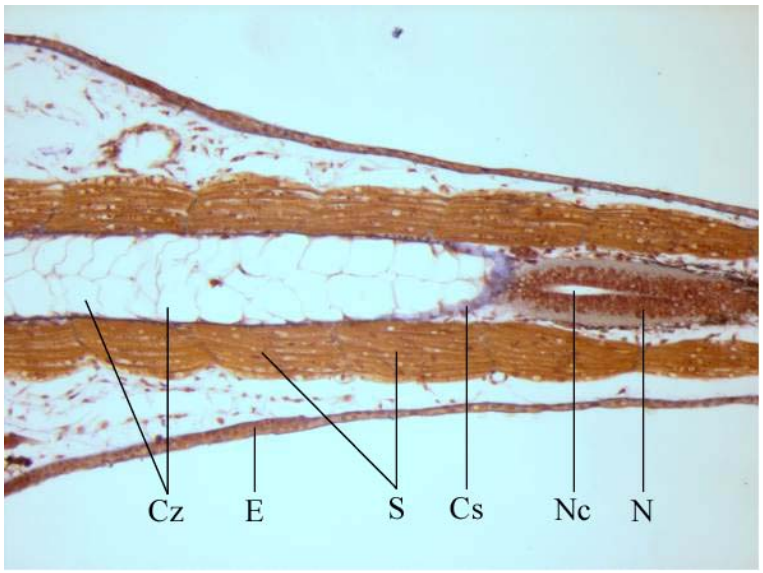


Abb.75: Detailansicht des Chorda- und Neuralrohrbereichs. **Cs** Chordascheide, **Cz** Chordazellen, **E** Epidermis, **N** Neuralrohr, **Nc** Neurocoel, **S** Somiten

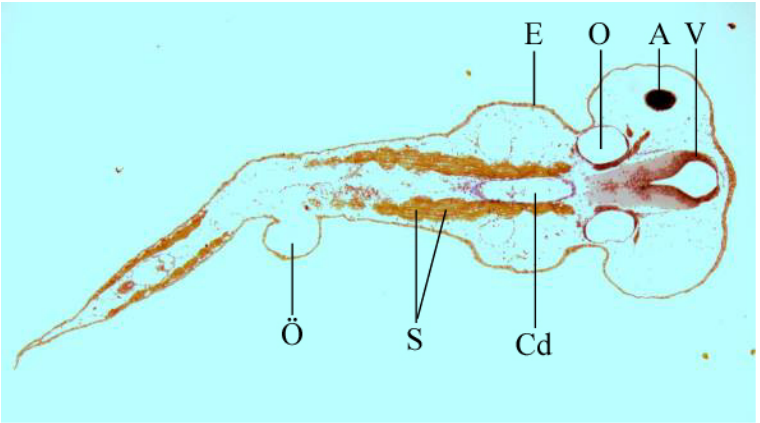


Abb.76: Frontalschnitt durch eine mißgebildete *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43 mit Ödem und skoliotischer Körperachse nach 48stündiger Exposition mit Retinol der Konzentration 0,2 g/l im Larvalstadium 14. **A** Augenbecher, **Cd** Chorda dorsalis, **E** Epidermis, **O** Ohrvesikel, **Ö** Ödeme, **S** Somiten, **V** Vorderhirn

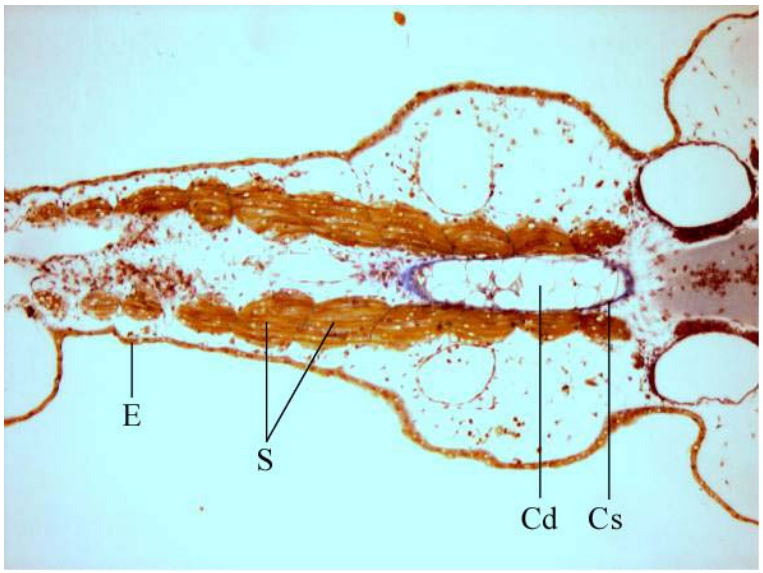


Abb.77: Detailansicht des kranialen Chordabereichs. **Cd** Chorda dorsalis, **Cs** Chordascheide, **E** Epidermis, **S** Somiten

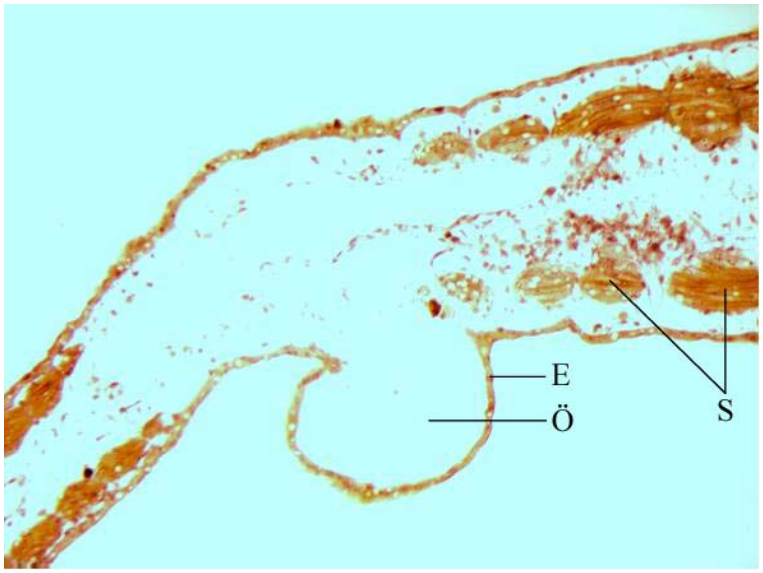


Abb.78: Detailansicht des ödematösen, skoliotischen Körperabschnitts.
E Epidermis, **Ö** Ödem, **S** Somiten

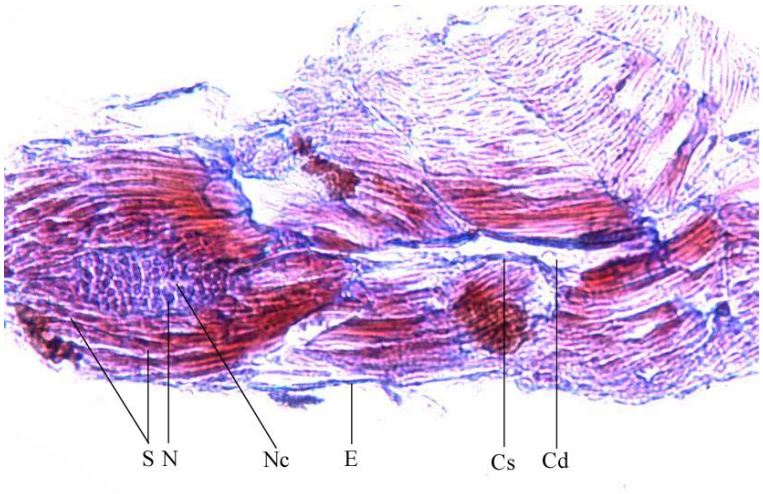


Abb.79: Frontalschnitt durch eine mißgebildete, 3 Tage alte *Brachydanio*-Larve nach 24stündiger Exposition mit ARIEL der Konzentration 0,2 ml/l im Entwicklungsstadium 12.
Cd Chorda dorsalis, **Cs** Chordascheide, **E** Epidermis, **N** Neuralrohr,
Nc Neurocoel, **S** Somiten

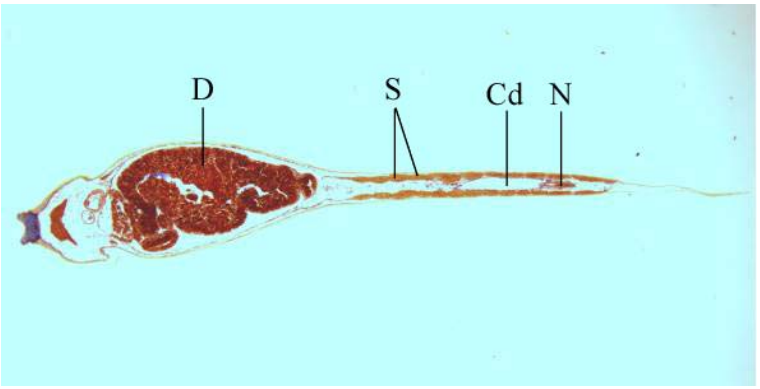


Abb.80: Frontalschnitt durch eine normalentwickelte *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43. **Cd** Chorda dorsalis, **D** Darm, **N** Neuralrohr, **S** Somiten

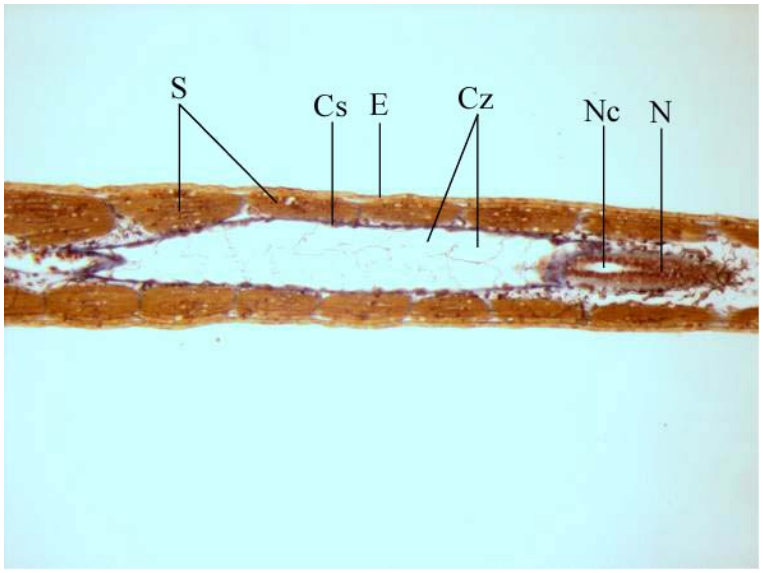


Abb.81: Detailansicht des Chorda- und Neuralrohrbereichs. **Cs** Chordascheide, **Cz** Chordazellen, **E** Epidermis, **N** Neuralrohr, **Nc** Neurocoel, **S** Somiten

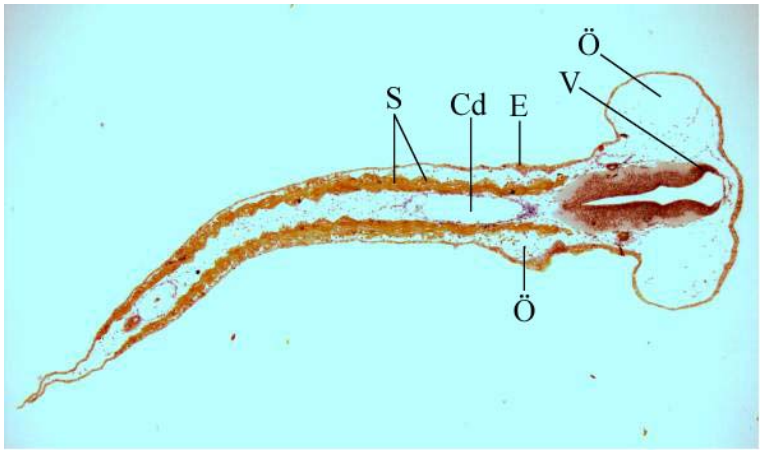


Abb.82: Frontalschnitt durch eine mißgebildete *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43 mit Kopfödemen und skoliotischer Körperachse nach 48stündigerExposition mit Retinol der Konzentration 0,2 g/l im Larvalstadium 14. **Cd** Chorda dorsalis, **E** Epidermis, **Ö** Ödeme, **S** Somiten, **V** Vorderhirn

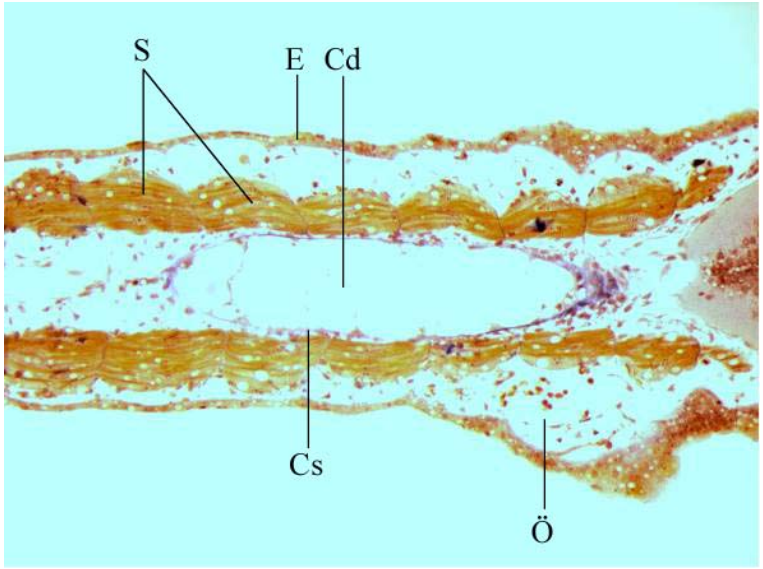


Abb.83: Detailansicht des Chordabereichs. **Cd** Chorda dorsalis, **Cs** Chordascheide, **E** Epidermis, **Ö** Ödem, **S** Somiten

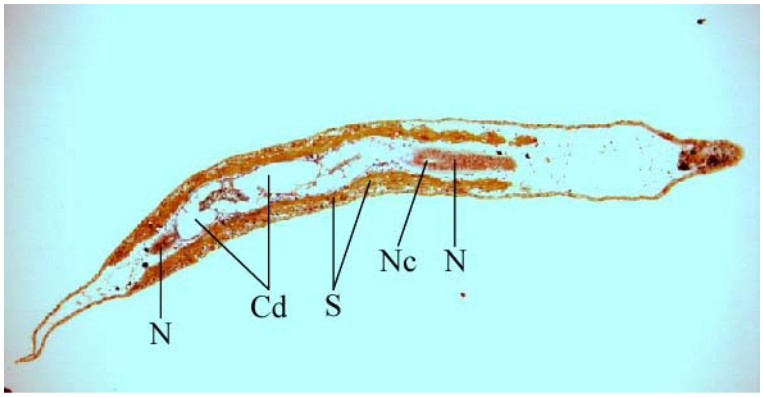


Abb.84: Frontalschnitt durch eine mißgebildete *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43 mit mehrfach gekrümmter Körperachse nach 24stündiger Exposition mit Retinol der Konzentration 0,2 g/l im Larvalstadium 14.
Cd Chorda dorsalis, **N** Neuralrohr, **Nc** Neurocoel, **S** Somiten

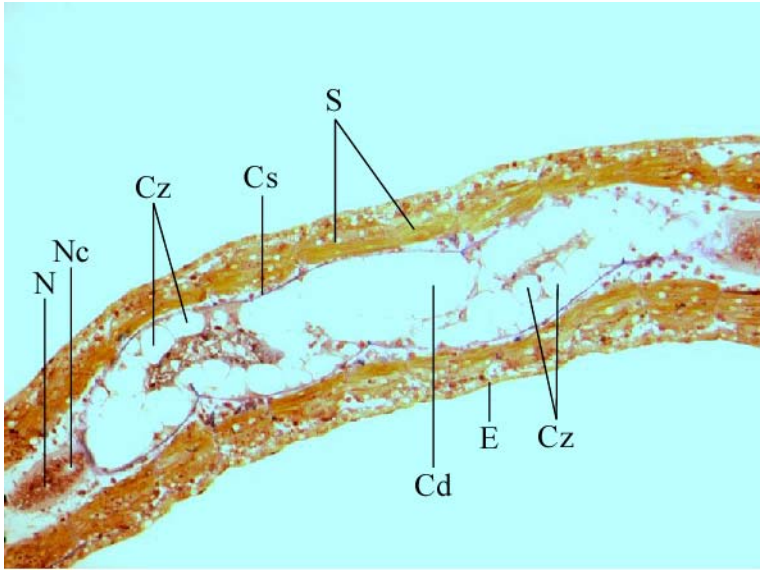


Abb.85: Detailansicht des Chordabereichs. **Cd** Chorda dorsalis, **Cs** Chordascheide, **Cz** Chordazellen, **E** Epidermis, **N** Neuralrohr, **Nc** Neurocoel, **S** Somiten

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das teratogene Potential von Detergentien bzw. Detergentiengemischen hinsichtlich ihrer Wirkung als Verursacher definierter skelettaler Mißbildungen während der Embryonalentwicklung zweier aquatischer Wirbeltiere zu untersuchen.

Durch den Vergleich mit der bekanntermaßen teratogenen Substanz Retinol sollten Erkenntnisse über das toxische Potential handelsüblicher Flüssigwaschmittel zur Auslösung von Wirbelsäulendefekten während der Embryogenese und Larvalentwicklung gewonnen werden. Die Vergleichsuntersuchungen an Fröschen, deren Defekte das Ergebnis einer Hypervitaminose A während der Embryogenese waren, sollten die skelettschädigende Wirkung der teratogenen Reinsubstanz Retinol verdeutlichen, um möglicherweise eine Aussage darüber machen zu können, ob der Mechanismus der Teratogenität von Detergentien dem des Retinols entspricht, oder, ob womöglich Waschmittelkomponenten innerhalb des multiplen Detergentiengemisches eine mit dem Retinoid vergleichbare Wirkungsweise zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich *In-vivo*-Methoden an frühen Stadien von *Xenopus laevis* und *Brachydanio rerio* angewandt, um zusätzlich zu den akuten Effekten einer frühen Detergentienexposition Aussagen über langfristige Konsequenzen für die Anatomie des sich entwickelnden Tieres treffen zu können.

Neben stereo- und lichtmikroskopischer Untersuchung der Embryonen, Larven und Jungtiere wurden histologische Übersichtspräparate angefertigt. Zur Darstellung skelettaler Defekte wurden Totalpräparate hergestellt, die durch Kontrastierung mit Alizarinrot S nach SPALTEHOLZ (1914, 1922) sichtbar gemacht werden konnten.

Für die Untersuchung von Gewebeveränderungen wurden histologische Präparate angefertigt und zur Differenzierung von kollagenem Bindegewebe und anderen Gewebetypen mit einer Azanfärbung nach HEIDENHAIN (1915, 1926) angefärbt.

4.1 Methoden in der toxikologischen Forschung

Bei der Untersuchung des teratogenen Potentials von Tensiden muß zwischen *In-vivo*- und *In-vitro*-Methoden unterschieden werden (DEMETRULIAS 1998).

In-vivo-Methoden zur Wirkung von Detergentien am Menschen wurden aus ethischen Gründen bislang nur zur Ermittlung lokaler Irritationen, vor allem der Haut und Schleimhaut, durchgeführt. Als Standardtests am Tier galten lange Zeit die von DRAIZE 1944 eingeführten Methoden zur Testung topisch applizierter Substanzen am Kaninchen (HERZINGER 1993). Der Draize-Test gerät wegen ethischer Aspekte und einer mangelnden Aussagekraft und Reproduzierbarkeit immer mehr in die Kritik (SWANSTON 1985; HERZINGER & KORTING 1991; JELINEK 2001).

Den *In-vivo*-Methoden gegenüberzustellen sind *In-vitro*-Methoden zur Abschätzung des teratogenen Potentials von Detergentien. Dieses sind Zytotoxizitätsuntersuchungen (GARLE et al. 1994; LOPRIENO et al. 1994), wie sie in diversen Arbeiten an Mikroorganismen (LAMMERS 1954, 1961; MENZEL 1960; RIETHE 1970; CHOI 1996) und eukaryotischen Zelltypen, darunter Keratinozyten (HERZINGER 1993; BIGLIARDI et al. 1994; DICKSON et al. 1994; EUN et al. 1994; LAWRENCE et al. 1995, 1996), Fibroblasten (CORNELIS et al. 1992; DAMOUR et al. 1992; LEE et al. 2000; JELINEK 2001) und Erythrozyten (BIELINSKA 1987; WINKLER 1990) durchgeführt wurden.

Es werden heute unterschiedlichste Methoden zur Ermittlung der Zytotoxizität angewandt. Einige dieser Methoden prüfen spezielle physiologische Leistungen, die nur von der lebenden Zelle erbracht werden, andere bestimmen die Membranintegrität der lebenden Zelle. Auch morphologische Veränderungen an der Zelle spielen eine große Rolle bei zytotoxikologischen Untersuchungen (JELINEK 2001).

Zur Bestimmung der physiologischen Leistung von Zellen kann die aktive Aufnahme von Stoffen, z.B. Neutralrot (MÜLLBACHER et al. 1984; OSBORNE und PERKINS 1994) oder [^{3}H]Uridin (KÜNSTLER 1988) durch die Zelle als Maß für ihre Vitalität gemessen werden.

Ein weiteres Vitalitätsmerkmal von Zellen ist das Reduktionsvermögen, das mit einem XTT-Test (BROSIN et al. 1997; RENZI et al. 1993) bestimmt werden kann. Bei diesem Test wird wie beim MTT-Test (ARECHABALA et al. 1999; KORTING et al. 1994) das Reduktionsvermögen mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen bestimmt, indem die Reduktion von Tetrazoliumsalzen zu farbigen Formazanen gemessen wird. Ein weiterer

heute angewandter Test zum Reduktionsvermögen lebender Zellen ist der Bindschedler's Grün-Leukobase-Test (BG) (YAMASHOJI 1996).

Als Maß für die Zellzahl gelten der DNA - oder Proteingehalt von Zellen, die beispielsweise durch den [^{3}H]Thymidin-Test zur Bestimmung der DNA-Menge (BENASSI 1999; GROTH et al. 1995) und den [^{3}H]Prolin-Test zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Zelle (BARILE et al. 1994) oder durch verschiedene Färbemethoden bestimmt werden.

Der Nachweis von Enzymen und Substraten wird als Maß für den Stoffwechsel lebender Zellen durchgeführt, z.B. durch Messung des intrazellulären ATPs (BUCHE et al. 1994), der Lactatproduktion (PHAM & HUFF 1994) oder des Glucoseverbrauchs (OSBORNE & PERKINS 1994).

Eine gestörte Membranintegrität der Zelle kann zum einen durch Färbemethoden, wie die Trypanblaufärbung (DE LEO et al. 1996; PARTEARROYO et al. 1990; RENZI et al. 1993) oder die Janus-Grünfärbung (PELS et al. 1993) bestimmt werden.

Zum anderen werden Methoden zur Bestimmung freigesetzter Zellinhalte, z.B. der Lactatdehydrogenase (LDH) (ARECHABALA et al. 1999; OSBORNE & PERKINS 1994; ROUGIER et al. 1992) oder der ß-N-Acetylglucosaminidase (ß-NAG) (MOL et al. 1986; OSBORNE & PERKINS 1994) angewandt.

Darüber hinaus können freigesetzte Membranbestandteile nachgewiesen werden, z.B. durch den [^{3}H]Arachidonsäure-Freisetzungstest (AART) (CARVER et al. 1993; KLÖCKING et al. 1994, 1995; MÜLLER-DECKER et al. 1992; VALENTINI 1998).

Die Darstellung morphologischer Zellveränderungen erfolgt im Rahmen von In-vitro-Untersuchungen neben licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen durch Agar-Overlay-Tests (LOPRIENO et al. 1994; ROUGIER et al. 1992), Färbemethoden (JIANG & ACOSTA 1993; VAUGHAN & PORTER 1993), und Bestimmung der Zellzahl (GLAUNER 1996; GUENICHE und PONEC, 1993), des Zellvolumens (GLAUNER 1996; WINKELMEIER et al. 1993) oder der Zelladhäsion (GROTH et al. 1995; LOPRIENO et al. 1994).

Neben den genannten molekularbiologischen Methoden zum physiologischen Zustand lebender Zellen gibt es verschiedene Untersuchungen zur Art des Zelltodes (LOO & RILLEMA 1998).

Dabei werden beispielsweise typische Merkmale der Apoptose (RAMACHANDRA und STUDZINSKI 1995), z.B. Histon-assoziierte DNA-Fragmente in den Zellen und die

Aufhebung des Phosphatidylserin-Gradienten an der Zellmembran, untersucht (DUVALL & WYLLIE 1986; VAN ENGLAND et al. 1996).
Makroskopische, histologische, zytologische und (epi-)genetische Erkenntnisse lassen sich heute bei der Betrachtung der Wirkung chemischer Noxen nicht mehr trennen.
Die Ergebnisse molekularbiologischer Forschung müssen daher in der Diskussion über die Toxizität chemischer Substanzen und Substanzgemische neben den Ergebnissen der angewandten In-vivo-Methoden berücksichtigt werden, da sie Aufschluß darüber geben können, was sich zum Zeitpunkt einer Exposition mit der chemischen Noxe auf zellulärer Ebene abspielt und welche Konsequenzen der Kontakt mit der toxischen Substanz für die Zelle hat.
Gerade für die embryotoxikologische Fragestellung ist das Schicksal einzelner Zellen von zentraler Bedeutung, da ihr Verbleib wegweisend für Erfolg und Mißerfolg von Differenzierung und Musterbildung einzelner Gewebe und letztlich des ganzen Organismus ist. Am Ende einer Kaskade teratogener zellulärer Ereignisse kann es, sofern es nicht zum Tod des Gesamtorganismus kommt, zur Ausprägung organischer Defekte kommen.

4.2 Toxizität von Waschmitteln und ihren Komponenten

Gegen Ende der Sechziger Jahre begann man in die Überlegungen zum biologischen und klinischen Einsatz von Detergentien nicht nur die Substanz selbst, sondern auch ihre Konzentration und die Dauer ihrer Einwirkung einzubeziehen (RIETHE 1966, 1967, 1968).
Detergentien sind nicht nur aufgrund ihres toxischen Potentials für das Individuum, sondern auch in ökotoxikologischer Hinsicht von Belang. Effekte auf Biozönosen wurden schon bei Konzentrationen von 0,1 mg/l festgestellt (STREIT 1994).
In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten embryotoxikologischen Versuchen konnte eine Abhängigkeit der Mortalität der Embryonen von der Konzentration des eingesetzten Detergens und der Dauer ihrer Einwirkung nachgewiesen werden. Da Tiere unterschiedlichen Entwicklungsstadiums eine unterschiedliche Empfindlichkeit für die eingesetzten Noxen zeigten, was sich in der prozentualen Sterblichkeit der Embryonen niederschlägt, muß das Entwicklungsstadium als weiterer Faktor in die Untersuchung mit einbezogen werden.

Die Sterblichkeiten von *Brachydanio*-Embryonen der frühen (Stadium 10) und späten (Stadium 12) Blastulaphase zeigten keinen signifikanten Unterschied. Das spätere Entwicklungsstadium 16, das die Phase der beginnenden Gastrulation repräsentiert, zeigte jedoch eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber den eingesetzten Substanzgemischen. Mit dem Fortschreiten der Embryonalentwicklung ging somit eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber Detergentien einher.

Detergentien wirken auf Organismen in unterschiedlichem Maße toxisch, da sie in ihrer Zusammensetzung mehr oder minder stark voneinander abweichen. Nach wie vor stehen bei der toxikologischen Betrachtung von Waschmitteln die Tenside im Vordergrund.

Anionische Tenside wurden unter anderem am haarlosen Rattenmodell getestet. In Bezug auf das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde beispielsweise die Penetration durch die Haut in darunterliegende Gewebe, sowie die dadurch verursachte systemische Exposition untersucht. Natriumdodecylsulfat drang in den Versuchen relativ tief in die Haut ein, so daß auch tiefe Hautschichten gut erreicht wurden. Bei kumulativer Behandlung war eine deutliche Erhöhung der Natriumdodecylsulfat-Konzentrationen in den unteren Schichten nachweisbar. Die im Blut zu findende Konzentration war jedoch nicht in der Lage, systemische Effekte zu verursachen (JELINEK 2001).

Kationische Tenside führen im Gegensatz zu anderen Tensiden gelegentlich zu oralen Vergiftungen (GLOXHUBER 1974), die unter Umständen auch tödlich enden können. Intravasal verabreicht verursachen kationische Tenside curareartige Wirkungen (TIESS & NAGEL 1967).

Innerhalb dieser Arbeit wurden mit dem Vollwaschmittel ARIEL und dem Feinwaschmittel PERWOLL zwei verschiedene Waschmitteltypen verglichen. Beide stellen als Flüssigwaschmittel Detergentiengemische dar, d.h. sie enthalten anionische, kationische und nichtionische Tenside. Entscheidend für die Giftigkeit und damit Begründung für den im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Toxizitätsunterschied ist aber die mengenmäßig unterschiedliche Konstellation der einzelnen Tensidklassen.

Das verwendete Waschmittel ARIEL weist einen Tensidanteil von insgesamt bis zu 50% auf, faßt man anionische, kationische und nicht-ionische Tenside zusammen. PERWOLL hingegen enthält einen insgesamt kleineren Tensidanteil von bis zu 40%, was allein durch einen weitaus geringeren Anteil anionischer Tenside zustande kommt. Der Anteil an kationischen und nichtionischen Tensiden ist bei ARIEL und PERWOLL vergleichbar.

Die beschriebene höhere Toxizität auf Wirbeltierembryonen des Vollwaschmittels ARIEL im Vergleich zum Feinwaschmittel PERWOLL scheint somit in dem Anteil anionischer Tenside begründet zu sein.

Detergentien enthalten nicht nur verschiedene Tenside, sondern stellen komplexe chemische Substanzgemische dar. Neben den bereits angesprochenen Tensiden besitzen mehrere der zahlreichen Komponenten eines Waschmittels das Potential auf Organismen toxisch wirken können.

Für Flüssigwaschmittel erübrigt sich beispielsweise meist der Zusatz von antimikrobiellen Wirkstoffen und Konservierungsmitteln (Aldehyde wie Formaldehyd, Glyoxal, Glutaraldehyd; Phenol- und Benzolderivaten wie o-Phenylphenol, p-Chlorkresol, o-Benzyl-Chlorphenol; Alkohole wie Ethanol und Iso-Propanol; Ampho-Tenside und quartäre Ammoniumverbindungen wie Trimethylstearylammoniumchlorid, Dodecylpyrimidinium-chlorid; Halogene wie Iod und Chlor; Isothiazolderivate) durch eine ausreichende Konzentration der obligatorischen Inhaltsstoffe (Tenside, Alkalien, Säuren, Bleichmittel), da einige der genannten Inhaltsstoffe auf Mikroorganismen direkt toxisch wirken und das Konzentrat über einen hohen osmotischen Druck verfügt, der das Wachstum von Mikroorganismen hemmt. Die toxischen Effekte der Substanzen auf einzellige Organismen legen die Vermutung nahe, daß die Wirkung auf Zellverbände besonders in der Differenzierungsphase nicht minder toxisch sein dürfte.

In Vollwaschmitteln sind meist Optische Aufheller enthalten, die heute in Verdacht stehen kanzerogen zu wirken. Dies ist bei dem bereits angesprochenen Vergleich von ARIEL und PERWOLL neben der unterschiedlichen Tensidkonstellation möglicherweise ein weiterer wichtiger Toxizitätsfaktor, denn ARIEL enthält optische Aufheller, die wiederum beim PERWOLL gänzlich fehlen.

Einen weiteren Unterschied zwischen Voll- und Feinwaschmittel stellen die Bleichmittel dar. Bleichmittel wirken im Sinne einer Oxidation. Da sie auch Farbstoffe zerstören, sind sie für gewöhnlich nicht in Feinwaschmitteln enthalten. Die Bleichwirkung von Natriumhypochlorit („Chlorbleiche“) beruht beispielsweise auf der Freisetzung von „aktivem Sauerstoff“ (O). Auch das in Waschmitteln eingesetzte Wasserstoffperoxid zerfällt in der alkalischen Waschlauge unter Bildung von „aktivem Sauerstoff“.

Natriumhypochlorit kann durch Nebenreaktionen toxische Chlorverbindungen erzeugen.

Beim Mischen von Hypochlorit mit Säuren, die wie bereits dargestellt ebenfalls als Zitronen- und Essigsäure in Waschmitteln enthalten sind, wird hochgiftiges Chlorgas freigesetzt.

In den letzten Jahren hat sich die sogenannte Sauerstoffbleiche aufgrund ihrer besseren Umweltverträglichkeit gegen die „Chlorbleiche“ durchgesetzt. Ihre Bleichwirkung geht von atomarem Sauerstoff (O, „aktiver Sauerstoff“) aus, der wesentlich reaktionsfreudiger ist als molekularer Sauerstoff (O_2).

Perboratbleiche ist erst ab höheren Temperaturen von etwa 60°C wirksam. Um auch bei niedrigeren Temperaturen eine Bleichwirkung zu erzielen, sind Bleichmittelaktivatoren notwendig, die in Kläranlagen nicht ausreichend zurückgehalten werden.

Da in Feinwaschmitteln Bleichmittel fehlen, werden natürlich auch keine Aktivatoren eingesetzt, was beim Toxizitätsunterschied zwischen ARIEL und PERWOLL möglicherweise eine weitere Rolle spielt. Die Toxizität des genannten Perborats ist allein aufgrund seines Borgehalts bedenklich. Bor beeinträchtigt ab 0,35 mg/l (0,3 ppm) das Wachstum von Wasserpflanzen (BRODERSEN 1989).

Auch Lösungsmittel finden sich nur im Vollwaschmittel, nicht aber im Feinwaschmittel, und weisen abgesehen vom Lösungsmittel Wasser, das einen nicht unerheblichen Teil der Flüssigwaschmittel ausmacht, ein hohes toxisches Potential auf.

Bei der Suche nach möglichen chemischen Verursachern von Entwicklungsstörungen sollten auch Enthärter als Waschmittelinhaltsstoffe nicht vergessen werden. Ihre Aufgabe liegt in der Entfernung härtebildender Ionen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} aus dem Wasser. Sofern die Integrität eines Zellverbandes gestört wird, können Enthärter möglicherweise Einfluß auf den Ionenhaushalt der Zellen nehmen und so langfristig zu einem Ionendefizit führen. Komplexbildner entfernen ebenfalls Ionen aus Wasser. Je nach Art des Komplexbildners werden aber nicht nur Calcium und Magnesium, sondern auch andere Metall-Ionen chemisch gebunden.

Zitronensäure wirkt ebenfalls wasserenthärtend, indem es Calcium-Ionen als Calciumcitrat ausfällt. Die dreiwertige Zitronensäure ist nur im getesteten Vollwaschmittel enthalten. Für das Feinwaschmittel ist keine Säure angegeben.

Zur Klärung der Frage, ob möglicherweise ein toxischer Einfluß der zumindest im Vollwaschmittel enthaltenen schwachen organischen Säuren wie Essig- oder Zitronensäure auf die Embryonalentwicklung besteht, dient die Betrachtung der 1989 veröffentlichten

Arbeit von KNOPEK, in der der Einfluß von Zitronensäure auf die Entwicklung der Kiemen des Zebrabärblings untersucht und mit anderen potentiellen Noxen wie Bleinitrat und Formaldehyd verglichen wurde.

Nach KNOPEK hatte eine Citrat-Konzentration über 100 mg/l Einfluß auf das Überleben der Fischlarven. Konzentrationen über 250 mg/l führten bei allen Larven nach spätestens einer Stunde zum Tod.

KNOPEK bestimmte einen LC_{50}-Wert für 48 Stunden von 132 mg Citrat / l Wasser.

Außerdem wurde der Einfluß von Zitronensäure auf den Schlüpferfolg der Fische untersucht. Bei 100 mg/l machte sich der Einfluß der Zitronensäure zuerst bemerkbar, was in einer Schlüpfungsrate von 87,4% im Vergleich mit der der Kontrollgruppe (97,1%) deutlich wurde. Mit zunehmender Citratkonzentration nahm die Schlüpfungsrate weiter ab, bis bei 250 mg/l keine der Larven mehr schlüpfte.

KNOPEK untersuchte darüber hinaus Wirbelsäulendefekte der Larven in Form abgeknickter oder verkürzter Schwänze, bzw. einer Verkrümmung der gesamten Larve. Solche Mißbildungen traten bei der Kontrollgruppe gar nicht auf, bei einer Citrat-Konzentration von 50 mg/l jedoch mit einer Häufigkeit von 1,1%.

Zitronensäure ist folglich prinzipiell in der Lage, die Entwicklung von Wirbeltieren zu beeinflussen und körperliche Mißbildungen herbeizuführen, doch entscheidend bleibt dafür ihre Konzentration.

Die von KNOPEK beschriebenen Wirbelsäulendefekte wurden in den Versuchen zu dieser Arbeit in ähnlicher Form gefunden, jedoch weitaus häufiger mit einem Maximum von 62,96% bei einer Detergens-Konzentration von 0,02 ml/l und einstündiger Exposition von *Brachydanio*-Larven des Entwicklungsstadiums 12.

Im Waschmittel ARIEL ist Zitronensäure nach Angaben des Herstellers mit etwa 1-5% enthalten. Dies ergibt umgerechnet auf die höchste Konzentration von ARIEL, die in den Versuchen dieser Arbeit verwendet wurde, eine maximale Citrat-Konzentration von höchstens 0,02 ml Zitronensäure pro Liter Lösung, was mehr als deutlich unter den von KNOPEK angegebenen Werten liegt.

Darüberhinaus enthält das ebenfalls untersuchte Feinwaschmittel PERWOLL nach Kennzeichnung durch den Hersteller keine Zitronensäure, was vor dem Hintergrund auch hier aufgetretener Mißbildungen das Citrat als potentiellen Verursacher der beschriebenen

Defekte entlastet. Ein Einfluß der Säure auf das zelluläre Geschehen, sowie die Interaktion mit anderen im Waschmittel enthaltenen Substanzen ist aber nicht auszuschließen.
Grundsätzlich kann sich die Giftigkeit einer im Waschmittel enthaltenen chemischen Substanz auch durch das Zusammenwirken mit anderen Inhaltsstoffen verändern. Die Stoffe können also durch andere im Detergens enthaltene Reaktionspartner beeinflußt werden, durch deren Vorhandensein sie aktiviert werden oder ihre Aktivität einbüßen.
Das Zusammenwirken mehrerer Substanzen beinhaltet somit möglicherweise ein noch größeres toxisches Potential, als es für die einzelnen Komponenten nachgewiesen wurde.
Neben den limitierenden Einflüssen von Waschmitteln auf das Überleben von Fischembryonen wurde in einem nicht unerheblichen Teil der durchgeführten Embryo-Larvalversuche auch eine gegenteilige Beobachtung gemacht. Nicht selten waren nämlich die Auswirkungen der am schwächsten konzentrierten Lösung (bei ARIEL 0,004 ml/l) in Bezug auf die Mortalität der Fischembryonen geringer als bei der Kontrollgruppe ohne Detergens. Dies darf vor dem Hintergrund der Erkenntnisse über Detergentien bzw. ihre Komponenten nicht als zufällige Erscheinung gewertet werden.
In den untersten Konzentrationsbereichen bleibt ARIEL für Fischembryonen, wie die Versuche verdeutlicht haben, ohne teratologische Folgen. ARIEL erweist sich aber bei einer Konzentration von 0,004 ml/l vermutlich für Mikroorganismen wie Pilze oder Bakterien schon als begrenzend, was durch Verhinderung entsprechender Infektionen während der sensiblen frühen Entwicklungsphasen wiederum förderlich für das Überleben der Embryonen zu sein scheint.

4.3 Makroskopische Veränderungen am Embryo durch Detergentien und Retinol

HINTZE-PODUFAL und VOGEL beschrieben 1985 die Wirkung von Detergentien auf Wirbeltiere als eine Retardation der Embryonalentwicklung in Form einer verzögerten Epibolie während der Gastrulation, die sich schon bei niedrigen Konzentrationen manifestierte. Sie beschrieben an mißgebildeten *Brachydanio*-Larven Zwergwuchs (Nanosomie) als häufige Mißbildungsform, zudem kraniale Defekte wie Anencephalie, Schwanzdysplasien und Schwanzreduktionen.

Dabei beobachteten sie einen fehlenden bzw. reduzierten larvalen Flossensaum schon bei kurzer Expositionsdauer. Bei langer Exposition kam es zu einer starken Reduktion des Flossensaums. Weiterhin beschreiben sie bei langer Expositionsdauer der Myelochisis vergleichbare Verschlußstörungen.

Die Detergentien führten zu einer Verhinderung der Ausbildung des Embryonalschildes und damit der Achsenorgane inmitten der Keimscheibe des Embryos. Dies hatte Defekte des gesamten Achsenskeletts zur Folge, also Mißbildungen von Kopfanlagen und Schwanzknospen, sowie Thorax- und Rumpfdysplasien. Ähnliche Defekte des Achsenskeletts wurden auch bei den exponierten Versuchstieren dieser Arbeit gefunden.

Die in den histologischen Bildern sichtbaren Anomalien von *Chorda dorsalis* und Somiten lassen verschiedene Vermutungen zu den Ursachen dieser Mißbildungen zu. Zum einen wird bei fehlgebildeten Embryonen und Larven wie beschrieben eine Vereinzelung von Muskelfasern der Somiten deutlich, die einen Verlust der Kompaktheit der Faserverbände zur Folge hat.

Da die Kontraktionskraft des Muskels *per definitionem* gleich der Summe der Kontraktionskraft der einzelnen Muskelfasern ist, resultiert aus der Abnahme der Fasermenge vermutlich eine Verringerung der Kontraktionskraft.

Die Ausrichtung der Wirbelsäule ist neben der Wirbelmorphologie eng an das Funktionieren der Somitenmuskulatur gebunden, die sozusagen den autochthonen, axialen Muskelanteil ausmacht.

Besonders Skoliosen der Versuchstiere, also Krümmungen der Wirbelsäule in der Frontalebene, erscheinen vor diesem Hintergrund als musculo-skelettale Phänomene.

Eine Verkrümmung der Wirbelsäule könnte folglich das Resultat der Tatsache sein, daß die Somitenmuskulatur ihre Aufgabe, das Achsenskelett schon während seiner embryonalen Entwicklung zu stabilisieren, aus genannten Gründen nicht erfüllen kann.

Ein Verlust der Symmetrie geht möglicherweise auch aus der unterschiedlichen Dicke der Somiten beim Vergleich der rechten und linken Körperhälften hervor. Eine Verbiegung der Wirbelsäule im Sinne einer Skoliose, wie sie auch in den histologischen Schnittbildern zu sehen ist, würde schließlich in einer Konkavität der gesunden Seite begründet sein, da der größere Muskelanteil auch über eine größere Kontraktionskraft verfügt.

Auch durch Beeinflussung durch andere pathologische Strukturen, wie Ödeme kann es zur Ausprägung von Wirbelsäulenmißbildungen kommen, sofern diese im axialen Bereich des Embryos plaziert sind.

So kann es im Falle von Ödemen, die sowohl in den Detergens-, als auch in den Retinolversuchen in recht unspezifischer Häufigkeit auftraten, beispielsweise zu einer Kompression der Somitenmuskulatur oder des Wirbelbereichs kommen. Dies hätte einen sozusagen sekundären Funktionsverlust der betroffenen Strukturen zur Folge.

Ödeme waren auch in den Untersuchungen von HINTZE-PODUFAL & VOGEL (1985) häufige Anomalien und waren häufig am Dottersack oder am Perikard zu finden (REICHENBACH-KLINKE 1976).

Die Todesursachen der Fisch- und Froschembryonen sind letztlich in einer Retardation der gesamten Entwicklung zu sehen. Nach Detergentieneinwirkung war die Entwicklung der Zebrafischembryonen der Testserien dieser Arbeit stark verlangsamt oder wurde angehalten. Stark geschädigte Larven waren dadurch nicht in der Lage zu schlüpfen.

Eine Wachstumsretardation und begleitende Skelettmißbildungen, wie sie von HINTZE-PODUFAL & VOGEL beschrieben wurden, konnten auch bei Ratten (DAVIS & MOORE 1934), Mäusen (NOETZEL 1939) und Hunden (MADDOCK et al. 1949) als Folge einer Hypervitaminose A gefunden werden. Bei den Versuchen mit Retinol-Palmitat war auch bei den *Xenopus*-Embryonen eine Entwicklungsverzögerung zu beobachten. Die Retinol-exponierten Frösche dieser Arbeit wiesen mit defekten und teilweise fehlenden Schultergürteln und multiplen Wirbeldeformationen entsprechende Skelettdefekte auf.

Exzessive Retinol-Gaben verursachten in den Testserien ähnlich wie Detergentien zusätzlich zu den Skelettdefekten viele verschiedene Mißbildungen. Die Art der Mißbildung ist dabei nicht zuletzt davon abhängig, in welchem Entwicklungsstadium die Applikation der Substanz erfolgt (GIROUD & MARTINET 1955).

An Mäusen und Ratten sind durch A-Hypervitaminose während der Neurulation entstandene Kopfmißbildungen wie Exenzephalie beschrieben worden (THEODOSIS & FRASER 1978). Kopfdefekte traten in den für diese Arbeit durchgeführten Tests mit Retinol ebenfalls häufig auf, vornehmlich in den frühen Embryonalstadien.

Allgemein zeigten die frühen Stadien 14, 16 und 18 von *X.laevis* eine höhere Empfindlichkeit für das eingesetzte Retinol als die späteren Stadien. Die LD_{50}-Werte der Detergentienversuche zeigen in Bezug auf *B.rerio*-Embryonen ein ähnliches Bild, da die

Toleranz der Fischembryonen gegenüber der Noxe im frühen Blastula-Stadium weitaus größer ist als im Stadium der späten Gastrula.

4.4 Zelluläre Grundlage von Schädigungen durch Detergentien und Retinol

Viele Autoren (BOSSARD 1949, 1957, 1958, 1963; MÜNCH 1962; HARTLMAIER 1958, 1964; ROIGK 1961) wiesen schon früh auf die „zytotoxische“ und „unbiologische“ Wirkung von Tensiden hin. REBEL erläuterte 1954 die Zytotoxizität grenzflächenaktiver Substanzen als „starke Wirkung der gebräuchlichen Netzmittel auf die einzelnen Zellen“ bis zu „irreversiblen Störungen der Zellstruktur“.

Toxikologische Versuche wurden hierzu in Form von Experimenten zur Wachstumshemmung von Einzellern durch RIETHE (1970), MENZEL (1960) und LAMMERS (1961) durchgeführt, wobei vor allem *Streptococcus salivarius* als Modellkeim diente (HERHOLZ 1975). LAMMERS (1954) beschrieb das heute weltweit am häufigsten verwendete Tensid Natriumlaurylsulfat (NALS) als wirkungsvolles Bakteriostatikum und „Anti-Enzym“ (HERHOLZ 1975).

Auch in den toxikologischen Versuchen dieser Arbeit wurde der Einfluß der eingesetzten Detergentien auf Mikroorganismen deutlich. Wie bereits beschrieben richtete sich die Wirkung des Detergens in den untersten Konzentrationsbereichen (0,004 ml/l ARIEL) nicht gegen den heranwachsenden Embryo, sondern wahrscheinlich gegen Pilze oder Bakterien, die unter normalen Bedingungen durch Besiedelung des Keimes die Überlebensrate der Tiere begrenzen. Der antimikrobielle bzw. antimykotische Wirkmechanismus beruht wahrscheinlich auf einer lytischen Schädigung der Membranen durch die Oberflächenaktivität der Detergentien, sowie auf einer Denaturierung von Pilz- bzw. Bakterienproteinen. Daneben ist nach Perforation der Zellmembranen auch mit Interaktionen der Detergentien mit Coenzymen zu rechnen, wodurch der Stoffwechsel der betroffenen Organismen gestört wird.

Die Wirkungen von Detergentien werden aus ähnlichen Gründen heute auch pharmazeutisch ausgenutzt, z.B. bei der Verwendung bestimmter Tenside zur Erhöhung der Penetration von Wirkstoffen durch die Haut (GUANGSHU et al. 2004). Als Haushalts- und Arbeitsstoffe stehen Detergentien aufgrund ihres ubiquitären Einsatzes besonders im Fokus

der dermatologischen Forschung, da sie „so häufig und regelmäßig in Kontakt mit der menschlichen Haut treten wie kaum je andere chemische Verbindungen“ (HERZINGER 1993). Tenside sind bekannt dafür, daß sie Haut-, Schleimhaut- und Augenirritationen verursachen können (EFFENDY & MAIBACH 1995; HERLOFSON & BARKVOLL 1996; KENNAH et al. 1989; SKAARE et al. 1997). Im Allgemeinen gilt für die Reizwirkung von Tensiden an der Haut die Rangfolge: nichtionische Tenside < anionische Tenside < kationische Tenside (GUANGSHU et al. 2004).

In vielen Arbeiten wurden Tenside mit der Entstehung exogener Dermatosen wie Kontaktekzemen in Verbindung gebracht (MATHIAS 1990; ORRIS 1982; PHILP 1980).

KLAUDER führte in einer epidemiologischen Studie 1962 einen Großteil der berufsbedingten Dermatosen auf den Kontakt mit Reinigungsmitteln zurück.

In Studien von NATER und DE GROOT (1985) gehörten Seifen oder Shampoos zu den nebenwirkungsreichsten der auf ihre Hautverträglichkeit hin untersuchten Produktgruppen.

In Untersuchungen der Wirkung von Netzmitteln auf die menschliche Mundschleimhaut machten MATTIG und JÄGER schon 1943 die Beobachtung, daß Netzmittel „eine andere Art der Desquamation“ hervorrufen, als sie unter normalen Bedingungen auftritt. Schäden der untersuchten Gewebe stellten sich in Form von „Tiefenrissen durch mehrere Lagen“ dar. Durch diese Beschädigung der natürlichen Schleimhautbarriere wurde im Zweifelsfall Noxen das Eindringen in tiefe Schichten des Gewebes ermöglicht. Dies schien besonders nach Kontakt mit Sulfonaten der Fall zu sein, die auch zu den Komponenten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Detergentien gehören und hier die Fraktion der anionischen Tenside ausmachen.

Auch WANNENMACHER (1961) führte Versuche zur Wirkung von Detergentien auf menschliche Schleimhaut durch. In Experimenten mit 2-5 %igen Lösungen des Detergens Laurylsarkosinat konnte er, besonders bei längeren Einwirkzeiten von 3-15 Minuten, ein vermehrtes Auftreten von Intermediär- und Basalzellen der Schleimhaut in Zellausstrichen nachweisen. Klinische Tests mit 2 %igem Na-Laurylsulfat ergaben bei Einwirkzeiten von 3 Minuten pathologische Effekte der Mundschleimhaut und Gingiva von Probanden (v.HEESEN & SCHAUPP 1970).

Nach HERHOLZ (1975) führt die Verwendung „zu einer Beeinflussung der Mundschleimhaut, welche als Reaktion eine verstärkte Epithel-Exfoliation zeigt.“

Für die Schäden an Haut und Schleimhaut werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die Hinweise auf die Detergentien-bedingten, zellulären Schädigungen während der Differenzierung und Musterbildung der untersuchten Wirbeltiere geben. Dazu gehören unter anderem Zytotoxizität (KORTING et al. 1994) und Wechselwirkungen mit Membranen (MOL et al. 1986).

Eine Zytotoxizität kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Wichtige Angriffspunkte für toxische Substanzen sind dabei die Störung der Membranfunktion, der Redoxhomöostase, der ATP- und Makromolekülsynthese sowie eine Schädigung des Erbguts (SCHWARZ 1996).

Toxische Zellveränderungen können reversibel sein, wie z.B. eine Bindung an Rezeptoren, die Komplexbildung mit Enzymen oder Permeabilitätsveränderungen von Membranen.

Nach HINTZE-PODUFAL und VOGEL (1985) sind in Bezug auf *Brachydanio* die Blastulastadien für Detergentien am empfindlichsten. Bei diesen Stadien weist die Eimembran eine hohe Permeabilität auf.

Durch Membranschäden ist die zelluläre Barriere nicht mehr vollständig intakt. Toxische Stoffe können so leichter in Gewebe eindringen. Des Weiteren werden wasserbindende Stoffe wie z.B. Harnstoff aus dem Gewebe herausgelöst (PROTTEY & FERGUSON 1975, SINGER & PITTZ 1997).

Da Tenside Moleküle darstellen, die hydrophile und hydrophobe Gruppen in größerem Abstand voneinander besitzen, sammeln sie sich an Grenzschichten wie Zellmembranen, die ihrerseits aus einer inneren hydrophoben Schicht und hydrophilen Außenschichten bestehen, in geordneter Form an und beeinflussen damit deren physikalische Eigenschaften. Durch die hydrophoben Ketten können Detergentien mit den Membranlipiden wechselwirken, die polare Gruppe wiederum ermöglicht die Lösung in polaren Lösungsmitteln wie Wasser. Die lipophilen Reste der Detergentien können sich in Membranen einlagern und so die Wechselwirkungen stören. Die Bildung von Micellen geht letztlich mit der Zerstörung der Membran einher.

Diese Veränderung der physikochemischen Strukturverhältnisse von Biomembranen könnte schließlich zur Leckbildung führen, aus der ein Verlust von Enzymen, Coenzymen und Stoffwechsel-Intermediaten resultiert.

Integrale Membranproteine interagieren über hydrophobe Aminosäurereste mit den Fettsäureresten der Phospholipide. Mit Detergentien wie Triton X-100 oder

Natriumdodecylsulfat (SDS), die häufig verwendete Labordetergentien sind, kann man die Moleküle aus der Membran herauslösen, wobei sie im Falle von SDS auch denaturiert werden. Detergentien wie Na-Laurylsarkosinat und Triton X werden heute für Lysis-Gebrauchslösungen verwendet, um eine Zerstörung von Kern- und Zellmembranen zu erreichen (MÜLLER 2003). Mittels starker Detergentien können die Zellmembranen denaturiert, DNA-Stränge entspiralisiert und dissoziiert werden (KOSMEHL et al. 2004).

Bei der Entstehung von Zellschäden durch Tenside spielen auch Interaktionen der Tenside mit Proteinen eine Rolle. Wie erwähnt bewirkt das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat starke Barriereveränderungen. Dabei tritt es sowohl mit Lipid- als auch mit Proteinstrukturen in Wechselwirkung (EFFENDY & MAIBACH 1995).

Es existieren verschiedene Arbeiten zur Wirkung von Detergentien auf das Hämoglobin-Molekül. Auf der Außenseite des Hämoglobin-Moleküls befinden sich überwiegend elektrisch geladene und dipolbildende Seitenketten, die das Molekül wasserlöslich machen (PERUTZ 1979; LÖFFLER 1979; SCHMIDT 1983). DUCK-CHONG (1983) untersuchte die unterschiedlichen Effekte der alkalischen Denaturierung des Hämoglobins in mütterlichem und fetalem Blut durch Detergentien, vor allem Triton X-100. Es schien in allen Fällen zu teilweisem Funktionsverlust des Hämoglobins durch Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Detergentien und dem Protein zu kommen.

WINKLER untersuchte 1990 den Einfluß von physiologischen Detergentien im Sinne von Gallensäuren (n-Octyl-β-D-Glucopyranosid (HBL 10), n-Octyltetraoxyethylen (HBL 14) und Na-Cholat (HBL 18)) auf Struktur und Funktion des Hämoglobin-Moleküls im Rahmen der Herstellung von Hb-Liposomen. Dabei beobachtete er einen konzentrationsabhängigen Einfluß der Detergentien auf das Hämoglobin in Form einer Abnahme der O_2-Affinität.

In der Arbeit von JELINEK (2001) wurde der Einfluß von Tensiden auf die mitochondriale Funktion und die Apoptose untersucht. Die Mitochondrien waren schon nach kurzer Exposition und bei geringen Tensidkonzentrationen beeinträchtigt

Einige Zellveränderungen sind irreversibel, z.B. Reaktionen wie Oxidation, Hydrolyse oder Bildung kovalenter Bindungen, sowie eine massive Störung der Membranfunktion. Dabei gilt immer, daß Wirkungen, die über einen physiologischen Schwankungsbereich hinausgehen, zum Tod der Zelle führen. Dieser kann nekrotisch oder apoptotisch sein (SCHWARZ 1996).

Während die Nekrose ausschließlich durch äußere Noxen ausgelöst wird und Entzündungen verursacht, stellt die Apoptose einen physiologischen Prozess dar, bei dem die Zelle nach „programmiertem“ Ablauf stirbt (NOLL 1997). Nekrotische Zellveränderungen führen in der Regel zur Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes (GILMAN 1982, NOLL 1997), was bei der Apoptose nicht der Fall ist (DUKE & COHEN 1986, DUVALL & WYLLIE 1986). Für Tenside werden überwiegend nekrotische Zellveränderungen angenommen. Solche Zellnekrosen können die Funktionstüchtigkeit des betroffenen Gewebes erheblich verringern.

Betrachtet man die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Mißbildungen von *B.rerio*, so wird deutlich, daß Detergentien in der Lage sind, die sich schnell teilenden Gewebe innerhalb eines Embryos empfindlich und im Gegensatz zu bereits ausdifferenzierten Geweben weitaus nachhaltiger zu stören. Aus diesem Grund waren in den toxikologischen Versuchen die frühesten Stadien von *B.rerio* (Entwicklungsstadium 10) auch gleichzeitig die empfindlichsten. Ein Detergentienkontakt läßt in Abhängigkeit von der Konzentration und der Dauer Zellen innerhalb der in der Differenzierung befindlichen Gewebe eines exponierten Tieres absterben. Gerade bei permanent aquatischen Embryonen und Larven, wie denen von *Xenopus* und *Brachydanio*, besteht während der Expositionsphase ein kontinuierlicher Kontakt von Geweben und noxenhaltigem Medium. Je nach Entwicklungsstadium des Tieres, also beispielsweise im Falle der Zebrafischembryonen des Stadiums 12, kommt es zu mehr oder weniger gravierenden, zytotoxischen Effekte der Detergentien innerhalb sich differenzierender Zellverbände. Je nach Lage der betroffenen Zellen, was wiederum vom Entwicklungstadium abhängt, führen die aus der zytotoxischen Wirkung der Detergentien resultierenden Nekrosen zu einer massiven Beeinträchtigung der vitalen, wandernden und sich ausdifferenzierenden Zellen. Diese Unterbindung der in der Embryogenese vorgesehenen Differenzierungs- und Musterbildungsaktivität der Zellen führt zu einer Retardation bzw. einem Fehlen bestimmter Differenzierungsschritte, die in der Fortentwicklung des Embryos nicht mehr kompensiert werden können. Für das Entwicklungsstadium 12 bedeutet das beispielsweise, daß durch Detergentienkontakt Zellen innerhalb der Keimscheibe kurz vor Beginn der Gastrulation absterben. Als Nekrosen verbleiben sie vorerst innerhalb des in dieser Entwicklungsphase äußerst aktiven Zellverbandes. Dies führt in der Folge zu einer Beeinträchtigung der umgebenden, vitalen Zellen, die ihre Aufgabe der Ausbildung der Achsenorgane zu Gastrulationsbeginn nicht

mehr in vollem Umfang ausüben können, woraus letztlich eine irreversible Fehlentwicklung der betreffenden Struktur, also im Falle des Achsenskeletts sehr häufig eine Wirbelsäulenverkrümmung resultiert. Dies war in den teratologischen Versuchen mit *Brachydanio* bei Applikation des Detergens ARIEL im Entwicklungsstadium 12 am häufigsten eine Skoliose.

Das Auftreten der verschiedenen Mißbildungstypen hing sowohl bei *Brachydanio*, als auch bei *Xenopus* stark vom Entwicklungsstadium ab, in dem sich die Embryonen bzw. Larven zum Zeitpunkt der Applikation einer Noxe befinden. Wirbelsäulendefekte traten bei beiden Versuchstieren und Noxen hauptsächlich in den frühen Stadien auf, d.h. bei *Brachydanio* am häufigsten im Stadium 12, bei *Xenopus* in den Stadien 14 bis 18.

Mißbildungen ganzer Organe oder anatomischer Strukturen wie der Wirbelsäule können als Folge von teratogener Beeinflussung letztlich das Ergebnis des Scheiterns weniger Zellen in der sensiblen Phase des Embryos sein. Die geschilderten Angriffspunkte von Detergentien an zellulären Strukturen führen letztlich alle dazu, daß Zellen innerhalb eines Embryos ihrem Entwicklungsauftrag nicht Folge leisten können, was zu einer fehlerhaften Differenzierung des betreffenden Gewebes oder zum Tod des Gesamtorganismus führt. Die Abnahme der Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen und Larven im Verlauf ihrer Entwicklung erklärt daher auch die sowohl beim Zebrafisch als auch beim Krallenfrosch abnehmende Empfindlichkeit der Embryonen bzw. Larven gegenüber allen drei eingesetzten Noxen (ARIEL, PERWOLL und Retinol).

Im Falle von *B.rerio* lag die letale Dosis von ARIEL im Entwicklungsstadium 16 mit 0,0237 ml/l deutlich über den Dosen der beiden früheren Stadien 10 und 12. Für das Stadium 10 konnte ein LD_{50} von 0,0089 ml/l, für das Stadium 12 von 0,01 ml/l ermittelt werden. In beiden frühen Entwicklungsstadien war damit bei einer Expositionszeit von 24 Stunden weniger als die Hälfte der Detergenkonzentration des späteren Stadiums 16 für 50% tödlich. Die toxikologischenVersuche an Xenopus zeigten eine nahezu gleiche Empfindlichkeit der frühen Embryonalstadien 14, 16 und 18 gegenüber Retinol, während die Embryonen des Stadiums 23 etwas unempfindlicher reagierten. Die Versuche mit den späteren Larvalstadien 42 und 53 zeigten eine sehr deutliche Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber dem Vitamin.

Die abnehmende Empfindlichkeit der Embryonen bzw. Larven läßt den Schluß zu, daß in den späteren Stadien die Entwicklung der Organsysteme, die sensibel auf die eingesetzten

Noxen reagieren, soweit fortgeschritten ist, daß Konzentrationen von Detergentien und Retinol, die in den frühen Stadien zu massiven Beeinträchtigungen führten, von den Tieren toleriert werden.

Der Mechanismus des teratogenen und dabei deutlich osteogenen Einflusses des Retinols besitzt bei der Entstehung von Defekten, im Gegensatz zu den „mechanischen“ Einflüssen der Detergentien auf die Zellstruktur, eine zusätzliche epigenetische Komponente.

Die anterio-posteriore, dorso-ventrale und Links-Rechts-Achse des Wirbeltierbauplans wird früh in der Embryonalentwicklung festgelegt. Transkriptionsfaktoren vom Homöobox(Hox)-Typ spielen in allen Phasen der Achsenentwicklung eine wichtige Rolle. Die Position der Extremitäten der Tetrapoden variiert in Bezug auf die Somiten, ist jedoch in Bezug auf die Hox-Genexpression gleich. Letztere führt zur Induktion der Bildung von Extremitäten und wird durch Retinsäure aktiviert. Retinoide vermitteln ihre vielfältigen Wirkungen zumeist in Form der Retinsäuren. Über Liganden-aktivierte, nukleäre Transkriptionsfaktoren reguliert Retinsäure eine Vielzahl an Entwicklungsprogrammen. Es gibt zwei Familien nukleärer Retinoid-Rezeptoren, RAR (Retinoic Acid Receptor) und RXR (Retinoic X Receptors) mit sechs Subtypen, die alle von unterschiedlichen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert werden. Die nukleären Rezeptoren werden durch die Bindung des entsprechenden Liganden aktiviert. Durch eine allosterische Konformationsänderung entstehen Rezeptordimere, die sich an spezifische regulatorische Elemente im Promotor eines Zielgens anlagern und so die Transkription initiieren. RXR kann als Hetero- und Homodimer wirken. Seine Fähigkeit, nicht nur mit RAR, sondern auch mit Rezeptoren anderer Familien Heterodimere auszubilden, weist auf die zentrale Rolle des RXR als Signalverstärker in zahlreichen Prozessen hin. Oft kommt es zu synergistischen Effekten (BALTES 2002), was in besonderem Maße für die auch in dieser Arbeit nachgewiesene teratogene Wirkung von Retinoiden entscheidend ist.

Die Retinoid-Rezeptor-Familien und ihre Subtypen weisen ein ausgeprägtes zeitliches und organspezifisches Verteilungsmuster auf, was besonders für die Wirkung der Retinoide auf Wachstum, Differenzierung und Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung ist.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der teratogene Einfluß von Detergentien und Retinol auf repräsentative Entwicklungsstadien des Zebrafisches *Brachydanio rerio* und des Krallenfroschs *Xenopus laevis* untersucht.

Für die Versuche mit den Flüssigwaschmitteln ARIEL und PERWOLL wurden die Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 von *B.rerio*, für die Versuche mit Retinol die frühen Entwicklungsstadien 14, 16,18, sowie die späteren Stadien 23, 42 und 53 von *X.laevis* ausgewählt, die unterschiedliche Entwicklungsvorgänge innerhalb des jeweiligen Embryos bzw. der Larve repräsentieren.

Die applizierten Noxen zeigten in allen untersuchten Stadien in Abhängigkeit von Konzentration und Expositionsdauer teratogene Effekte auf die Embryonalentwicklung.

Bei der Bestimmung von Mortalität und Letaler Dosis (LD_{50}) konnte gezeigt werden, daß mit fortschreitender Entwicklung der Embryonen die Empfindlichkeit für die eingesetzten Substanzen abnahm. Das Vollwaschmittel ARIEL erwies sich im Vergleich zum Feinwaschmittel PERWOLL als grundsätzlich toxischer in Bezug auf das Überleben der Zebrafischembryonen.

Bei der Bestimmung des prozentualen Schlüpferfolges wurde eine Entwicklungsverzögerung exponierter Fische deutlich, die sich organisch dokumentieren ließ. Es kam zu multiplen Mißbildungen des Kopfes, der Augenanlagen und der Ohrplakode. Fehlbildungen des Rumpfes zeigten sich bezüglich des Flossensaums, der Pigmentierung und der Schwanzentwicklung.

Die besonders in den frühen Embryonalstadien häufig gefundenen Mißbildungen der Wirbelsäule wurden gesondert untersucht. Es zeigte sich, daß gerade im Stadium 12 der Zebrafischentwicklung nach Exposition übermäßig viele Schäden in Bezug auf fehlgestaltete Wirbel und Verkrümmungen der gesamten Wirbelsäule auftraten.

Durch Retinol ließen sich neben multiplen skelettalen Mißbildungen der Wirbelkörper, der Wirbelsäule, der Extremitäten und der Extremitätengürtel, ähnlich wie durch die untersuchten Detergentien, auch viele nicht-skelettale Organ- und Kopf- bzw. Rumpfmißbildungen hervorrufen.

6 Literaturverzeichnis

ARECHABALA, B., COIFFARD, C., RIVALLAND, P., COIFFARD, L.J., DE ROECK-HOLTZHAUER, Y.J. (1999): Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *Appl. Toxicol.* 19 (3), 163-5

ARNHOLD, T. (1999): Untersuchungen zum Metabolismus von Vitamin A / Retinoiden im Hinblick auf eine Risikoabschätzung ihrer teratogenen Wirkung beim Menschen. *Diss.* Braunschweig 1999

BACHMANN, J. (2002): Entwicklung und Erprobung eines Teratogenitäts-Screening Testes mit Embryonen des Zebrabärblings *Danio rerio*. *Diss.* Dresden 2002

BALTES, S. (2002) Einfluss von Retinoiden auf die Differenzierung und Permeabilität der Caco-2 Zellkultur als Modell für die Gastrointestinale Barriere. *Diss.* Hannover 2002

BARILE, F.A., DIERICKX, P.J., KRISTEN, U. (1994): In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 155-162

BENASSI, L., BERTAZZONI, G., SEIDENARI, S. (1999): In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch tests on human volunteers. *Contact Dermatitis* 40 (1), 38-44

BEYER, C. (2004): Der Einfluss von all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure, Methanol und TSH unter verschiedenen Kulturbedingungen auf den ^{125}I-Stoffwechsel von kultivierten Thyreozyten und deren RARα- und RXRα-Rezeptoren. *Diss.* Tübingen 2004

BIELINSKA, I. (1987): Dielectric, haematological and biochemical studies of detergent toxicity in fish blood. *Phys. Med. Biol.* 32, 623-635

BIGLIARDI, P.L., HERRON, M.J., NELSON, R.D., DAHL, M.V. (1994): Effects of detergents on proliferation and metabolism of human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 3, 89-94

BOSSARD, F.J. (1949): Zur Frage der Zahnpflegemittel. *Schweiz. Mschr. Zahnheilk.* 59, 731-733

BOSSARD, F.J. (1957): Mundpflege und Oberflächenspannung des Speichels. *Zahnärztl. Praxis* 8, 3

BOSSARD, F.J. (1958): Reaktion der Gingiva durch Kochsalz. *Zahnärztl. Rdsch.* 67, 122

BOSSARD, F.J. (1963): Hyperhydratation und Ödem bei Parodontopathien. *Zahnärztl. Praxis* 14, 242

BOUIN, P. (1897): Etudes sur l`évolution normale et l`involution du tube séminifère. *A. Anat. Micr.* 1, 225-339

BRODERSEN, I., DUVE, F. (Hg.) (1989): Öko-Test Ratgeber Waschen und Putzen. Reinbeck, Rowohlt

BROSIN, A., WOLF, V., MATTHEUS, A., HEISE, H. (1997): Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salt in human keratinocytes (HaCaT). *Acta Derm. Venereol. Suppl.* 77, 26-28

BUA-Stoffbericht (1997): Ökotoxikologie ausgewählter Tenside für den Wasch- und Reinigungsbereich. Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker. S. Hirzel – Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

BUCHE, P., VIOLIN, L., GIRARD, P. (1994): Evaluation of the effects of cosmetic or dermopharmaceutical products on cutaneous energy metabolism using the episkin model of recontructed epidermis. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 381-385

CARVER, M.P., REIGLE, R., DE SALVA, S.J. (1991): Arachidonic acid release from three skin culture models in response to surfactant-based irritants. In: Goldberg, A., M.: Alternative Methods in Toxicology: *In Vitro Toxicol.* Vol. 3 - Mechanisms and New Technology 9, 277-284

CHOI, I. (1996): Untersuchungen zur kombinativen Wirkung ausgewählter Phosphorsäureester und Tenside auf Acetylcholinesterase und auf Mikroorganismen am Beispiel *Vibrio fischeri*. *Diss.* Bremen, 1996

CORNELIS, M., DUPONT, C., WEPIERRE, J. (1992): Prediction of eye irritancy potential of surfactants by cytotoxicity tests in vitro on cultures of human skin fibroblasts and keratinocytes. *Toxic. In Vitro* 6 (2) 119-128

DAMOUR, O., HUA, S.Z., LANSE, F., VILLAIN, M., ROUSELLE, P., COLLOMBEL, C. (1992): Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns* 18, (6), 479-485

DEMETRULIAS, J., DONNELLY, T., MORHENN, V., JESSEE, B., HAINSWORTH, S., CASTERTON, P., BERNHOFER, L., MARTIN, K., DECKER, D. (1998): Skin2 – an in vitro human skin model: the correlation between in vivo an in vitro testing of surfactants. *Exp. Dermatol.* 7, 18-26

DICKSON, F.M., LAWRENCE, J.N., BENFORD, D.J. (1994): Cytotoxicity of 12 chemicals of known human and animal skin irritation potential in human keratinocyte cultures. *Toxicol. in vitro* 8, (4) 661- 663

DOOLEY, K., ZON, L.I. (2000): Zebrafish – a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10, 252-256.

DRAIZE, J.H., WOODARD, G., CALVERY, H.O. (1944): Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377-390

DUCK-CHONG, C.G. (1983): Differential effect of detergents on the alkaline denaturation of hemoglobin in maternal and fetal blood, with particular reference to Triton X-100. *J. Clin. Pathol.* 36, 910-914

DUKE, R.C., COHEN, J.J. (1986): IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res.* 5, 289-299

DUVALL, E., WYLLIE, A.H. (1986): Death and the cell. *Immunol. Today* 7, 115-119

EFFENDY, I., MAIBACH, H.I. (1995): Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 33, 217-225

VAN ENGLAND, M., RAMAEKERS, F.C.S., SCHUTTE, B., REUTLINGSPERGER, C.P.M. (1996): A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24, 131-139

EUN, H.C., CHUNG, J.H., JUNG, S.Y., CHO, K.H., KIM, K.H. (1994): A comparative study of the cytotoxicity of skin irritants on cultured human oral and skin keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 130, 24-28

FISHER, S., HALPEREN, M.E. (1999): Patterning the zebrafish axial skeleton requires early chordin function. *Nature Genetics* 23, 442-446

FUSSMANN, G., NAGEL, R. (1997): Laborvergleichsversuch – Embryotest mit dem Zebrabärbling *Danio rerio*. *Federal Environmental Protection Agency of Germany*, Report No. 106 03 908.

GARLE, M., J., FENTEM, J., H., FRY, J., R. (1994): In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. *Toxicol. in Vitro* 8, (6), 1303-1312

GASCHE, P. (1943): Die Zucht von *Xenopus laevis* (DAUD.) und ihre Bedeutung für die biologische Forschung. *Rev. Suisse Zool.* 50

GILMAN, M.R. (1982): Skin and Eye Testing in Animals. In: Wallace Hayes, A.: Principles and Methods of Toxicology. New York: Raven Press, 209-222

GIROUD, A., MARTINET, M. (1955): Malformations embryonaires par hypervitaminosis A. *Arch. Fr. Ped.* 12, 1-9

GLAUNER, B. (1996): Cytotoxicity quantification with a cell counter and analyzer system. Application note cont. April, 24-25

GLOXHUBER, Ch. (1974): Toxicological properties of surfactants. *Arch. Toxicol.* 32, 245-270

GOODMAN, De.W.S., BLANER, W.S. (1984): Biosynthesis, absorption and hepatic metabolism of retinol. In Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds, *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, 2nd ed. Raven Press, New York, pp 1-39

GROTH, T., FALCK, P., MIETHKE, R.R. (1995): Cytotoxicity of biomaterials – basic mechanisms and in vitro test methods: a review. ATLA 23, 790-799

GUANGSHU, Z., RAMSEIER, C., WIDMER, M., ZOLLINGER, A., ZÜRCHER,R. (2004): Anthropogene Schadstoffe: Anionische Tenside. ETH Zürich

GUENICHE, A., PONEC, M. (1993): Use of human skin cell cultures for the estimation of potential skin irritants. *Toxicol. in Vitro* 7 (1), 15-24

HART, N.H., DONOVAN, M. (1983): Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *Journal of Experimental Zoology*, 227, 277-296.

HARTLMAIER, K.M. (1958): Biologische Mundpflege. *Zahnärztl. Mitt.* 46, 80-83

HAUGEN, B.R., LARSON, L.L., PUGAZHENTHI, U., HAYS, W.R., KLOPPER, J.P., KRAMER, C.A., SHARMA, V. (2004): Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (1), 272-80

HAUSSLER, M.R., WHITFIELD, G.K., HAUSSLER, C.A., HSIEH, J.C., THOMPSON, P.D., SELZNICK, S.H., DOMINGUEZ, C.E., JURUTKA, P.W. (1998): The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner Res.* 13, 325-349

V.HEESEN, W., SCHAUPP, H. (1970): Geschmacksstörungen durch Mundpflegemittel. *HNO* 18, 137

HEGER, W. et al. (1998): Ökologische Testverfahren mit aquatischen Organismen. Chemikaliengesetz H. 11. Umweltbundesamt [Hrsg.]

HEIDENHAIN, M. (1915): Über die Mallorysche Bindegewebsfärbung mit Karmin und Azokarmin als Vorfarben. *Z. w. M.* 32, 361-372

HEIDENHAIN, M. (1926): Färbungen. *Enzykl. mikr. Techn.* 3. Aufl., 1, 680-687

HERHOLZ, M. (1975): Wirkung von Detergentien auf die Mundschleimhaut – exfoliativ zytologische Untersuchungen. *Diss.* Frankfurt a. M. 1975

HERLOFSON, B., BARKVOLL, P. (1996): The effects of two toothpaste detergents on the frequency of recurrent aphthous ulcers. *Acta Odontol. Scand.* 54, 150-153

HERMANN, K. (1995): Teratogenic effects of retinoic acid and related substances on the early development of the zebrafish (*Brachydanio rerio)* as assessed by a novel scoring system. *Toxic. In vitro* 9 (3) 267-283

HERZINGER, T., KORTING, H.C. (1991): In-vitro-Verfahren zur Bewertung der Hautverträglichkeit von Chemikalien – speziell Detergentien. *Dermatosen* 39 (4), 117-123

HERZINGER, T. (1993): Zum Vergleich der zytotoxischen Wirkung von Tensiden auf humane Keratinozyten, HaCaT-Zellen und 3T3-Fibroblasten in vitro mit der Hautverträglichkeit am Menschen in vivo. *Diss.* München 1993

HINTZE- PODUFAL, CH., VOGEL, S. (1985): Embryonale Mißbildungen am Zebrabärbling *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) nach Einwirkung von Detergentien. *Zool. Anz. Jena* 215 1/2, 9-17

HISAOKA, K.K., BATTLE, H.I. (1958): The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 102, 311-328.

HISAOKA, K.K., FIRLIT, C.F. (1960): Further studies on the embryonic development of the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Journal of Morphology*, 107, 205-225.

JELINEK, A. (2001): In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose. *Diss.* Halle (Saale) 2001

JIANG, T., ACOSTA, D. (1993): An in vitro model of cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Fund. Appl.Toxicol.* 20, 486-495

KALTER, H., WARKANY, J. (1959): Experimental production of congenital malformations in mammals by metabolic procedure. *Physiol. Rev.* 39, 69-115

KENNAH, H.E., HIGNET, H.S., LAUX, P.E., DORKO, J.D., BARROW, C.S. (1989): An objective procedure for quantitating eye irritation based upon changes of corneal thickness. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12, 258-268

KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R., ULLMANN, B. SCHILLING, T.F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203, 253-310.

KLAUDER, J.V. (1962): Actual causes of certain occupational dermatoses. *Arch. Dermatol.* 85, 49-62

KLÖCKING, H.P., SCHLEGELMILCH, U., KLÖCKING, R. (1994): Assessment of membrane toxicity using [^{3}H]arachidonic acid release in U937 cells. *Toxicol. in Vitro* 8: 775-777

KLÖCKING, H.P., SCHLEGELMILCH, U., KLÖCKING, R. (1995): [3H]arachidonic acid release as an alternative to the eye irritation test. In: *Ocular Toxicology* (Eds.: Weisse I, Hockwin O, Green K, Tripathi RC) New York, London: Plenum Press, pp. 255-261.

KNOPEK, L. (1989): Die normale Entwicklung der Kiemen des Zebrabärblings (*Brachydanio rerio* Ham.-Buch.) und deren Veränderung nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Bleinitrat, Formaldehyd und Citronensäure. *Diss.* Göttingen 1989

KORTING, H.C., SCHINDLER, S., HARTINGER, A., KERSCHER, M., ANGERPOINTER, T., MAIBACH, H.I. (1994): MTT-assay and neutral red release (NRR)-assay: Relative role in the prediction of the irritancy potential of surfactants. *Life Sci.* 55, 533-540

KÜNSTLER, K. (1988): Alternative Methoden in der Industrie am Beispiel der Haut- und Schleimhautverträglichkeitsprüfung. In: Stuttgart, New York: Tierschutz durch Alternativen (Hrsg.: Schuppan/Hardegg) Gustav Fischer Verlag,

LAMMERS, T. (1954): Die Bedeutung der Zahnpaste für die Kariesprophylaxe. *Dtsch. Zahnärztebl.* 8, 643

LAMMERS, T. (1961): Die Bedeutung der Zahnpaste für die Kariesprophylaxe. *Dtsch. Zahnärztebl.* 63, 628

LANGE, M., GEBAUER, W., MARKL, J., NAGEL, R. (1995): Comparision of testing acute toxicity on embryo of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30 (11) 2087 – 2102

LAUX, K. (1960): Die grenzflächenaktiven Stoffe. *Chem. Technologie*, 154, 160, 169

LAWRENCE, J.N., BENFORD, D.J. (1995): Comparison of tumor promotor-induced prostaglandin E2 release in human and rat keratinocytes. *Carcinogenesis* 16, (5), 1247-1251

LAWRENCE, J.N., DALLY, J.J.P., BENFORD, D.J. (1995): Measurement of eicosamoid release in keratinocyte cultures to investigate skin irritation and tumor promoting activity. *Toxicol. in Vitro* 9, (3), 285-290

LAWRENCE, J.N., STARKEY, S., DICKSON, F.M., BENFORD, D.J. (1996): Use of human and rat keratinocyte cultures to assess skin irritation potential. *Toxicol. in Vitro* 10, 331-340

LEE, J.K., KIM, D.B., KIM, J.I., KIM, P.Y. (2000): In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicol. In Vitro* 14 (4), 345-349

DE LEO, V.A., Carver, M.P., Hong, J., Fung, K., Kong, B., De Salva, S. (1996): Arachidonic acid release: an in vitro alternative for dermal irritancy testing. *Food Chem. Toxicol.* 34, (2) 167-176

LÖFFLER, G., PETRIDES, P.E., WEISS, L., HARPER, H.A. (1979): Physiologische Chemie. 2. Aufl., Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

LOO, D.C., RILLEMA, J.R (1998): Measurement of cell death. *Meth. Cell Biol.* 57, 251-264

LOPRIENO, N., BONCRISTIANI, G., BOSCO, E., NIERI, M., LOPRIENO, G. (1994): The Galileo data bank on toxicity testing with in vitro alternative methods. II.Toxicology profiles of 20 chemicals. ATLA 22, 82-114

LUNDVALL, H. (1904): Über Demonstration embryonaler Knorpelskelette. *An. An.* 25, 219-222

LUNDVALL, H. (1906): Weiteres über Demonstrationen embryonaler Knorpelskelette. *An. An.* 27, 520-523

LUNDVALL, H. (1912): Über Skelettfärbung und Aufhellung. *An. An.* 40, 639-646

LUNDVALL, H. (1927): Färbung des Skelettes in durchsichtigen Weichteilen. *An. An.* 62, 353-373

MATHIAS, C.G.T., ADAMS, R.M. (1990): Soaps and detergents. In: *Occupational Skin Disease*, 311-325

MATTIG, G., JÄGER, R. (1943): Netzmittel und Paradentalschäden. *Klin. Wschr.* 22, 748

MENZEL, O. (1960): Einwirkung von Netzmitteln auf Paramezien und auf die Mundschleimhaut in zytologischer Sicht. *Diss.* Münster 1960

MOL, M.A.E., GENDEREN, J., WOLTHUIS, O.L. (1986): Cultured human epidermal cells as a tool in skin toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 24 6/7, 519-520

MONTE WESTERFIELD (1997): The Zebrafish book. Siehe http://zfin.org/zf info/ Zfbook/zfbk.html

MÜLLBACHER, A., PARISH, C., R., MUNDY, J., P. (1984): An improved colorimetric assay for T cell cytotoxicity in vitro. *J. Immunol. Methods* 68, 205-215

MÜLLER-DECKER, K., FÜRSTENBERGER, G., MARKS, F. (1992): Development of an in vitro alternative assay to the Draize skin irritancy test using human keratinocyte-derived proinflammatory key mediators and cell viability as test parameters. *In Vitro Toxicol.* 5, (4), 191-209

MÜNCH, J. (1962): Gedanken über unsere Mundpflegemittel. *Zahnärztl. Mitt.* 52, 2-23

NAGEL, R. (1994): Complete life cycle tests with zebrafish – a critical assessment of the results. In: Müller, R. & Lloyd, R. (eds.), Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. FAO, Fishing New Books, Blackwell Science, 188-195.

NAGEL, R. (2002): *Dar*T: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. *ALTEX* 19, Suppl. 1/02, 38-48

NATER, J.P., DE GROOT, A.C. (1985): Unwanted effects of cosmetics and drugs used in dermatology. *Elsevier Science Publishers*, 2nd Ed., 224-233

NIEUWKOOP, P.D., FABER, J. (1975): Normal Tables of *Xenopus laevis* (DAUDIN). Amsterdam: North Holland Publ. Co.

NOLL, M. (1997): Apoptose: Mord und Selbstmord im menschlichen Organismus. *Pharm. Zeitung* 23, 11-17

NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1994): Of flies and fishes. *Science*, 266, 5185, 572-574.

OCHSE, W. (1948): Die Zucht des südamerikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. *Gynaecologia* 126: 57-77

OELGESCHLÄGER, M. (2004): Embryonale Musterbildung durch BMP-Signalgradienten. MPG, Tätigkeitsbericht 2004

ORLANDI, M., MANTOVANI, B., AMMAR, K., AVITABILE, E., DAL MONTE, P., BARTOLINI, G. (2003): Retinoids and cancer: antitumoral effects of ATRA, 9-cis RA and the new retinoid IIF on the HL-60 leukemic cell line. *Med. Princ. Pract.* 12 (3), 164-9

ORRIS, L., TESSER, M. (1982): Dermatoses due to water, soaps, detergents and solvents. *Occupational and Industrial Dermatology*, 23-27

OSBORNE, R, PERKINS, M.A. (1994): An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food Chem. Toxicol.* 32, 133-142

PARTEARROYO, M.A., OSTOLAZA, H., GONI, F.M., BARBERA-GUILLEM, E. (1990): Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. A study using B16 melanom cells. *Biochem. Pharmacol.* 40, (6), 1323-1328

PELS, E., NUYTS, R.M.M.A.; BREEBAART, A.C., HARTMANN, C. (1993): Rapid quantitative assays for corneal endothelial cell viability in vitro. *Cornea* 12 (4), 289-294

PERUTZ, M.F. (1979): Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 327-386

PHAM, X.T., HUFF, J.W. (1999): Cytotoxicity evaluation of multipurpose contact lens solutions using an in vitro test battery. *CLAO J.* 25 (1), 28-35

PHILP, J.M. (1980): Anionic surfactants: Dermatological observations (Humans). In: *Anionic Surfactants-Biochemistry, Toxicology, Dermatology, Surfactant Sci. Ser.*, Vol.10, 309-325

PROTTEY, C., FERGUSON, T. (1975): Factors which determine the skin irritation potential of soaps and detergents. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 26, 29-46

RALHAN, R., KAUR, J. (2003): Retinoids as chemopreventive agents. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 17 (1), 66-91

RAMACHANDRA, S., STUDZINSKI, G.P. (1995): Morphological and biochemical criteria of apoptosis. In: Cell Growth and Apoptosis a practical approach (Ed.: G. P. Studzinski) Oxford, New York, Tokyo: IRL Press et Oxford Univercity Press,

REBEL, H.H. (1954): Zahnfleischveränderungen nach Netzmitteln. Die Medizinische 46, 1557

REICHENBACH-KLINKE, H. (1976): Überblick über die für Fische schädlichen Gifte im Abwasser. *Fische und Umwelt* 2, 3-7

RENZI, D., VALTOLINA, M., FORSTER, R. (1993): The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA* 21, 89-96

RIETHE, P. (1966): Beitrag zur Wirkung grenzflächenaktiver Stoffe auf die Gingiva. *Les Paradontopathies*, 347

RIETHE, P. (1967): Studien zur Mundhygiene mit grenzflächenaktiven Stoffen. *J. Soc. cosm. Chem.* 18, 291

RIETHE, P. (1968): Plaque-Hemmwirkung nach örtlicher Applikation von grenzflächenaktiven Stoffen im Tierexperiment. *Dtsch. zahnärztl. Z.* 23, 542

RIETHE, P. (1970): Paramecium caudatum als Indikator für den Einfluß grenzflächenaktiver Substanzen. *Deutsche Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde* 54, 37

ROIGK, H. (1961): Gedanken über unsere Mundpflegemittel. *Zahnärztl. Mitt.* 51, 1003-1005

ROSCHGER, P., MATSUO, K., MISOF, B.M., TESCH, W., JOCHUM, W., WAGNER, E.F., FRATZL, P., KLAUSHOFER, K. (2004): Normal mineralization and nanostructure of sclerotic bone in mice overexpressing Fra-1. *Bone* 34 (5), 776-782

ROUGIER, A., COTTIN, M., DE SILVA, O., ROGUET, R., CATROUX, P., TOUFIC, A., DOSSOU, K. (1992): In vitro methods: their relevance and complementarity in ocular safety assessment. *Lens and eye Toxicol. Res.* 9, 229-245

SCHÄFERS, C., NAGEL. R. (1993): Toxicity of 3,4 Dichloroaniline to perch (*Perca fluviatilis*). In acute and early life stage exposures. *Chemosphere* 26 (9) 1641-1651

SCHARF, S., HOBINGER, G., SEIF, P. (1995): LAS in der Umwelt. Literaturstudie Und Untersuchung zu Waschmittelinhaltsstoffen. Bundesministerium für Umwelt [Hrsg.], Wien

SCHWARZ, L.R. (1996): Cytotoxizität. In: *Toxikologie* (Hrsg.: Greim/Demel), Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 117-134

SINGER, E.J., PITTZ, E.P. (1997): Interaction of surfactants with epidermal tissues: Biochemical and toxicological aspects. In: Surfactants in cosmetics (Ed.: Rieger, M.M.) New Jersey, New York, Basel: Warner Lambert Company Morris Planes, 1997

SKAARE, A., KJAERHEIM, V., BARKVOLL, P., ROLLA, G. (1997): Skin reaction and irritation potential of four commercial toothpastes. *Acta Odontol. Scand.* 55

SPALTEHOLZ, W. (1914): Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten. 2. Aufl. Leipzig

SPALTEHOLZ, W. (1922): Das Durchsichtigmachen als biologische Arbeitsmethode. *Handb. der biol. Arbeitsmeth.*, hrsg. von Abderhalden. Abt. 9, Teil 1 (Lief. 71)

STAHLSCHMIDT-ALLNER, P. (1992): Toxikokinetik und Toxikodynamik von grenzflächenaktiven Stoffen in aquatischen Organismen. Gutachten im Auftrag des Umweltbundesamtes: Institut für Zoologie, Univ. Mainz

STREIT, B. (1994): *Lexikon Ökotoxikologie*, 2. Aufl., Weinheim 1994

SWANSTON, D.W. (1985): Assessment of the validity of animal techniques in eye-irritation testing. *Food. Chem. Toxicol.* 23, 169-173

THEODOSIS, D.T., FRASER, F.C. (1978): Early changes in the mouse neuroepithelium preceding exencephaly induced by hypervitaminosis A. Teratology 18, 219-232

TIESS, D., NAGEL, K.H. (1967): Beitrag zur Morphologie und Analytik der Invertseifenintoxikation. *Arch. Toxikol.* 22, 333-348

TIGL, M.E. (2001): Teratogenität von natürlichem Vitamin A unter besonderer Betrachtung der Dysraphien der Wirbelsäule. *Inauguraldiss.* Mainz 1999

VALENTINI, H. (1998): Untersuchungen zur Bewertung potentieller Augenreizstoffe mit dem [^{3}H]Arachidonsäurefreisetzungstest an U937-Zellen. *Diss.* Jena 1998

VAUGHAN, J.S., PORTER, D.A. (1993): A new in vitro method for assessing the potential toxicity of soft contact lens care solutions. *CLAO J.* 19 (1), 54-57

VETTER, R. (1994): Untersuchungen zur Muskelversorgung und Innervierung der Vorderextremitäten normaler und fehlgebildeter Krallenfrösche *Xenopus laevis* (DAUDIN), sowie zu Entwicklungsstörungen nach A-Hypervitaminose während der Embryogenese und Larvalentwicklung. *Diss.* Göttingen 1994

WANNENMACHER, E. (1961): Auswirkungen von Zahnpflegemitteln auf Zahnhartgewebe und Schleimhaut. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 63, 934

WINKELMEIER, P., GLAUNER, B., LINDL, T. (1993): Quantification of cytotoxicity by cell volume and cell proliferation. *ATLA* 21, 269-280

WINKLER, B. (1990): Untersuchungen zur Wirkung von Detergentien auf Struktur und Funktion des Hämoglobin-Moleküls. *Diss.* Tübingen 1990

WOOD, R.J., TCHACK, L., ANGELO, G., PRATT, R.E., SONNA, L.A. (2004): DNA microarray analysis of vitamin D-induced gene expression in a human colon carcinoma cell line. *Physiol. Genomics* 17, 122-129

YAMASHOJI, S. (1996): A cytotoxicity assay with Bindschedler's Green Leuco Base. *Anal. Biochem.* 240, 310-312

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

B. rerio	*Brachydanio rerio*
BWS	Brustwirbelsäule
HCG	humanes Choriongonadotropin
HWS	Halswirbelsäule
K	Kontrolle
LWS	Lendenwirbelsäule
M.	*Musculus*
n.n.	nicht nachweisbar
Proc.	*Processus*
Procc.	*Processus* (Pl.)
SWS	Schwanzwirbelsäule
W	Wirbel
WS	Wirbelsäule
X. laevis	*Xenopus laevis*

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Strukturformeln anionischer Tenside
Abb.2: Strukturformeln nichtionischer Tenside
Abb.3: Strukturformeln optischer Aufheller
Abb.4: Strukturformeln von Bleichmitteln
Abb.5: Strukturformeln von Lösungsmitteln
Abb.6: Strukturformel von Retinol-Palmitat
Abb.7: Frühe Blastula von *Brachydanio rerio*
Abb.8: Späte Blastula von *Brachydanio rerio*
Abb.9: Gastrula von *Brachydanio rerio*
Abb.10: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition
Abb.11: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 nach 24-stündiger Exposition
Abb.12: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 24-stündiger Exposition
Abb.13: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 nach 24-stündiger Exposition
Abb.14: Prozentuale Sterblichkeiten von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition
Abb.15: Prozentuale Sterblichkeiten von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24 -stündiger Exposition
Abb.16: Vergleich der Toxizität von ARIEL und PERWOLL auf Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 bei 1-stündiger Exposition
Abb.17: LD_{50}, Entw.stadium 12, Exposition 1h
Abb.18: LD_{50}, Entw.stadium 12, Exposition 24h
Abb.19: LD_{50}, Entw.stadium 10, Exposition 24h
Abb.20: LD_{50}, Entw.stadium 12, Exposition 24h
Abb.21: LD_{50}, Entw.stadium 16, Exposition 24h
Abb.22: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition
Abb.23: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 nach 24-stündiger Exposition

Abb.24: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 24-stündiger Exposition
Abb.25: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 nach 24-stündiger Exposition
Abb.26: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition
Abb.27: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24-stündiger Exposition
Abb.28: Prozentuale Häufigkeit von Mißbildungen des Entwicklungsstadiums 12 nach ein- bzw. 24stündiger Exposition
Abb.29: Häufigkeit verschiedener Mißbildungstypen im Entwicklungsstadium 12 nach Exposition für 1 bzw. 24 Stunden
Abb.30: Prozentuale Häufigkeit verschiedener Mißbildungen der Wirbelsäule im Entwicklungsstadium 12
Abb.31: Lateralansicht eines normalentwickelten Zebrabärblings
Abb.32: Lateralansicht eines Fisches mit Nanosomie
Abb.33: Lateralansicht eines Zebrafisches mit Nanosomie und Kyphose der LWS
Abb.34: Lateralansicht eines Fisches mit Nanosomie und Lordose der HWS
Abb.35: Lateralansicht eines Zebrafisches mit Kyphose der LWS
Abb.36: Alizarinfärbung eines normalentwickelten Zebrabärblings, Lateralansicht
Abb.37: Alizarinfärbung eines Zebrabärblings mit Kyphose der BWS, Lateralansicht
Abb.38: Ausschnitt der kyphotischen BWS-Region, Lateralansicht
Abb.39: Lateralansicht eines Zebrafisches mit Nanosomie, deformiertem Schädel, Kyphose der BWS und Lordose der HWS und SWS
Abb.40: Lateralansicht eines Fisches mit Kyphose der LWS und Lordose der HWS
Abb.41: Lateralansicht eines Fisches mit Lordose der HWS
Abb.42: Alizarinfärbung eines Zebrabärblings mit Lordose der LWS/SWS, Lateralansicht
Abb.43: Ausschnitt der lordotischen BWS/LWS-Region, Lateralansicht
Abb.44: Alizarinfärbung eines Zebrabärblings mit leichter Lordose der LWS/SWS, Lateralansicht
Abb.45: Ausschnitt der lordotischen BWS/LWS-Region, Lateralansicht
Abb.46: Zebrabärbling mit deutlicher Lordose der SWS und Kyphose der LWS

Abb.47: Zebrabärbling mit deformiertem Schädel, Lordose der HWS/BWS und Kyphose der BWS
Abb.48: Dorsalansicht eines Zebrabärblings mit Skoliose der SWS
Abb.49: Dorsalansicht eines Zebrafisches mit Skoliose der SWS
Abb.50: Dorsalansicht eines Fisches mit Skoliose der SWS
Abb.51: Dorsalansicht eines Zebrabärblings mit Skoliose der LWS und deformierter SWS
Abb.52: Dorsalansicht eines normalentwickelten Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66
Abb.53: Dorsalansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit Nanosomie und einseitiger Amelie der Vordergliedmaßen
Abb.54: Lateralansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit deformierten Extremitätengürteln
Abb.55: Lateralansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit deformiertem Extremitätengürteln
Abb.56: Dorsalansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit Deformation des Beckengürtels und Skoliose der Wirbelsäule
Abb.57: Dorsalansicht eines Krallenfroschs des Entwicklungsstadiums 66 mit Vorderextremitätenamelie
Abb.58: Alizarinfärbung eines Krallenfrosches mit beidseitiger Amelie der Vorderextremitäten und multiplen Wirbeldeformationen, Dorsalansicht
Abb.59: Detailansicht der Wirbelsäule
Abb.60: Alizarinfärbung eines *X.laevis* mit beidseitig funktionslosen Armen und multiplen Wirbeldeformationen, Dorsalansicht
Abb.61: Detailansicht der Wirbelsäule
Abb.62: Alizarinfärbung eines Krallenfrosches mit einseitiger Amelie der Vorderextremitäten und multiplen Wirbeldeformationen, Dorsalansicht
Abb.63: Detailansicht der Wirbelsäule
Abb.64: Alizarinfärbung der vorderen Wirbelsäule eines Krallenfrosches mit diagonaler Spaltbildung des W II und konsekutiver Verwachsung der Wirbelhälften mit den Nachbarwirbeln, Dorsalansicht
Abb. 65: Alizarinfärbung der Kreuzbeinregion eines *X.laevis* mit Knochensporn an der Basis des Urostyls, Dorsalansicht

Abb.66: Alizarinfärbung des Sakralwirbels eines *X.laevis* mit Knochensporn an der Basis des Urostyls, Dorsalansicht
Abb.67: Querschnitt durch eine normalentwickelte *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43
Abb.68: Detailansicht des Chorda- und Neuralrohrbereichs
Abb.69: Querschnitt durch eine mißgebildete *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43
Abb.70: Detailansicht des Chorda- und Neuralrohrbereichs
Abb.71: Sagittalschnitt einer normalentwickelten *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43
Abb.72: Detailansicht des Chordabereichs
Abb.73: Sagittalschnitt einer mißgebildeten, 3 Tage alten *Brachydanio*-Larve
Abb.74: Frontalschnitt durch eine normalentwickelte *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43
Abb.75: Detailansicht des Chorda- und Neuralrohrbereichs
Abb.76: Frontalschnitt durch eine mißgebildete *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43 mit Ödem und skoliotischer Körperachse
Abb.77: Detailansicht des kranialen Chordabereichs
Abb.78: Detailansicht des ödematösen, skoliotischen Körperabschnitts
Abb.79: Frontalschnitt durch eine mißgebildete, 3 Tage alte *Brachydanio*-Larve
Abb.80: Frontalschnitt durch eine normalentwickelte *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43
Abb.81: Detailansicht des Chorda- und Neuralrohrbereichs
Abb.82: Frontalschnitt durch eine mißgebildete *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43 mit Kopfödemen und skoliotischer Körperachse
Abb.83: Detailansicht des Chordabereichs
Abb.84: Frontalschnitt durch eine mißgebildete *Xenopus*-Larve des Entwicklungsstadiums 43 mit mehrfach gekrümmter Körperachse
Abb.85: Detailansicht des Chordabereichs

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Mikrobiologische Analyse I des Göttinger Trinkwassers
Tab.2: Mikrobiologische Analyse II des Göttinger Trinkwassers
Tab.3: Chemische Analyse I des Göttinger Trinkwassers
Tab.4: Chemische Analyse II des Göttinger Trinkwassers
Tab.5: Chemische Indikatorparameter des Göttinger Trinkwassers
Tab.6: Physikalisch-chemische Analyse des Göttinger Trinkwassers
Tab.7: Zusatzstoffe zur Aufbereitung des Göttinger Trinkwassers
Tab.8: Härte des Göttinger Trinkwassers
Tab.9: Wasserhärtebereiche
Tab.10: Bleichmittel
Tab.11: Lösungsmittel in Haushaltsreinigern
Tab.12: Säuren in Haushaltsreinigern
Tab.13: Gefährliche Inhaltsstoffe des Vollwaschmittels ARIEL
Tab.14: Inhaltsstoffe des Vollwaschmittels ARIEL
Tab.15: Inhaltsstoffe des Feinwaschmittels PERWOLL
Tab.16: Fixierung, Entwässerung und Paraffinierung
Tab.17: Modifizierte Azan-Färbung nach HEIDENHAIN
Tab.18: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition
Tab.19: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 nach 24-stündiger Exposition
Tab.20: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 24-stündiger Exposition
Tab.21: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 nach 24-stündiger Exposition
Tab.22: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition
Tab.23: Prozentuale Sterblichkeiten von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24-stündiger Exposition
Tab.24: Prozentuale Sterblichkeit von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition mit ARIEL

Tab.25: Prozentuale Sterblichkeit des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition mit PERWOLL
Tab.26: LD_{50}-Werte von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition
Tab.27: LD_{50}-Werte von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24-stündiger Exposition
Tab.28: Empfindlichkeitsbereiche für die Versuche mit 1- bzw. 24-stündiger Exposition
Tab.29: Empfindlichkeitsbereiche für die Versuche mit 24-stündiger Exposition
Tab.30: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1-stündiger Exposition
Tab.31: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 10 nach 24-stündiger Exposition
Tab.32: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 24-stündiger Exposition
Tab.33: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 16 nach 24-stündiger Exposition
Tab.34: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition
Tab.35: Prozentualer Schlüpferfolg von Embryonen der Entwicklungsstadien 10, 12 und 16 nach 24-stündiger Exposition
Tab.36: Prozentuale Häufigkeit der Mißbildungen von Embryonen des Entwicklungsstadiums 12 nach ein- bzw. 24-stündiger Exposition
Tab.37: Häufigkeit verschiedener Mißbildungstypen des Entwicklungsstadiums 12 nach Exposition für 1 bzw. 24 Stunden
Tab.38: Häufigkeit verschiedener Mißbildungen der Wirbelsäule im Entwicklungsstadium 12
Tab.39: Erläuterungen und Schemazeichnungen zu den gemessenen Wirbelabschnitten
Tab.40: Messungen einzelner Wirbel und Wirbelabschnitte normalentwickelter Krallenfrösche

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Prof. Dr. rer. nat. Christel Podufal für die Betreuung meiner Arbeit, die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und ihren reichen Erfahrungsschatz.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralf Heinrich für die Übernahme des Korreferats.

Meinen Eltern Angelika und Werner Schlomm möchte ich für die über weite Strecken gewährte finanzielle Unterstützung danken.

Meinen Freunden Dipl. Biol. Matthias Schmitz und Dr. rer. nat. Thomas Butterbrodt danke ich für ihre Hilfe beim Formatieren und Korrekturlesen der Arbeit und darüberhinaus für viele gute Gespräche.

Frau Gerda-Maria George, Frau Marion Knierim-Grenzebach, Herrn Dipl. Biol. Ralf Schünemann und Herrn Carsten Wortmann im Zoologischen Institut sei ebenfalls für ihre Hilfsbereitschaft gedankt.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ahmed Mansouri möchte ich mich für die Erlaubnis bedanken, die Geräte im Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie zusätzlich für meine Untersuchungen benutzen zu dürfen.

Herrn Dipl. Ing. Werner Müller danke ich für die Hilfe beim Druck der Dissertation.

Allen Freunden, Kommilitonen und Kollegen, die mir im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, sei zusammenfassend nocheinmal gedankt.

Lebenslauf

Persönliche Daten	Markus Schlomm Diplom-Biologe geboren am 05.11.1975 in Werl deutsche Staatsangehörigkeit

Schulbildung

08/1982-07/1986	Walburgis-Grundschule Werl
08/1986–07/1995	Privates Ursulinengymnasium Werl, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1996–04/2001	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen, Anfertigung der Diplomarbeit am III. Zoologischen Institut - Entwicklungsbiologie der Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Insekten-ontogenese und Wirbeltierembryologie (Prof. Dr. Ch. Podufal) mit dem Thema „Mandibel und Lacinia der Schabe *Gromphadorhina brunneri* BUTLER (Blaberoidea, Oxyhaloidae): Bau und Funktion“
05/2001–05/2006	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am III. Zoologischen Institut - Entwicklungsbiologie der Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Insektenontogenese und Wirbeltierembryologie (Prof. Dr. Ch. Podufal)